

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATASHA STOPINSKI TRIAQUIM

Myrsine parvula (Mez) Otegui (PRIMULACEAE): ESTUDO FITOQUÍMICO,
MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ATIVIDADE
ALELOPÁTICA E ENSAIOS DE TOXICIDADE *IN VITRO*

CURITIBA

2018

NATASHA STOPINSKI TRIAQUIM

Myrsine parvula (Mez) Otegui (PRIMULACEAE): ESTUDO FITOQUÍMICO,
MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ATIVIDADE
ALELOPÁTICA E ENSAIOS DE TOXICIDADE *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profª Drª. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientadora: Profª Drª. Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA

2018

Triaquim, Natasha Stopinski

Myrsine parvula (Mez) Otegui (Primulaceae): estudo fitoquímico, morfoanatômico, propriedades antioxidantes, atividade alelopática e ensaios de toxicidade *in vitro* / Natasha Stopinski Triaquim – Curitiba, 2018.

100 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Deise Prehs Montrucchio

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Antioxidante. 2. Flavonoides. 3. Toxicidade. 4. Primulaceae. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Montrucchio, Deise Prehs. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 583.672



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATASHA STOPINSKI TRIAQUIM** intitulada: *Myrsine parvula* (Mez) Otegui (Primulaceae): ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO, PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ATIVIDADE ALELOPÁTICA E ENSAIOS DE TOXICIDADE *IN VITRO*, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


Curitiba, 08 de Março de 2018.


MARILIS DALLARMI MIGUEL

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


CRISTINA PEITZ DE LIMA

Avaliador Externo (UNIBRASIL)


DEISE PREHS MONTRUCCHIO

Avaliador Externo (UFPR)


JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho ao meu esposo que esteve ao meu lado em todos os momentos, sendo meu incentivador, sempre com uma palavra de ânimo. Aos meus pais e irmãos pelo apoio, incentivo, orações e interesse em me ver feliz e realizada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelas bênçãos e cuidado com minha vida em todo tempo.

Gratidão a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, sozinha seria impossível realizá-lo.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel pela confiança, incentivo, boas ideias, acolhida, amizade, conselhos não só para o trabalho, mas que levarei para a vida.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Deise Prehs Montrucchio pelo apoio, dedicação, paciência, amizade e correções minuciosas.

Ao Prof Dr Obdulio Gomes Miguel pela colaboração em todo o processo fitoquímico, pelas conversas, conselhos e amizade.

A Prof^a Dr^a Josiane de Fátima Gaspari Dias pelos conselhos, orientações e amizade.

A todos os professores das disciplinas cursadas ao longo do mestrado que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A especialista no gênero *Myrsine*, Maria de Fátima de Freitas, pela gentileza em identificar a espécie.

Ao Técnico Paulo Sérgio Diniz pela ajuda no dia a dia, ao secretário da coordenação da Pós-Graduação Jean Paulo Godoi pela disposição em nos ajudar.

Ao Rafael Rosenstock Voltz pelo auxílio na coleta da espécie.

A Vanessa Bobek com o auxílio na pesquisa morfoanatômica, na UEPG.

A Camila Oliveira e Katlin Rech pela colaboração nas análises e identificação do RMN, ao Vinicius Bednarczuk de Oliverira pela análise de CLAE realizada.

Ao Departamento de Química da UFPR pelos espectros de RMN.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos amigos do grupo de pesquisa pela colaboração, conversas, risadas, compartilhando dúvidas e conhecimento, vocês fizeram meus dias mais divertidos no laboratório.

A minha família e amigos por todo o apoio, palavras de incentivo, paciência e torcida, amo muito vocês.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar o estudo fitoquímico, morfoanatômico, alelopático, a toxicidade preliminar e atividade antioxidante do extrato bruto e frações da folha e galho da *Myrsine parvula* (Primulaceae), motivado pela escassez de estudos relacionados a espécie. Por meio de ensaios fitoquímicos foi detectado qualitativamente a presença de flavonoides, esteroides, triterpenos, taninos, antraquinonas e iridoide. A partir do extrato bruto foram obtidas frações por meio de fracionamento com solventes em escala crescente de polaridade: fração hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. A fração acetato de etila da folha foi submetida a análise pela CLAE e posterior confirmação dos constituintes mediante Ressonância Magnética Nuclear (RMN), onde compostos fenólicos (ácido gálico e rutina) foram identificados. A morfoanatomia da folha, pecíolo e galho da espécie seguiu metodologia padrão de microscopia ótica e eletrônica, com ensaios histoquímicos. A lâmina foliar apresentou cutícula estriada e ondulada, estômatos anisocíticos (sendo hipoestomática) e meso-filo dorsiventral. Células secretoras de substâncias de natureza lipofílica foram observadas na folha, pecíolo e galho, assim como a presença de compostos fenólicos evidenciados por cloreto férrico. Amido e drusas de oxalato de cálcio no pecíolo foram detectados. Os ensaios de atividade antioxidante indicaram boa capacidade antioxidante, destacando-se as frações acetato de etila da folha e galho na redução do radical DPPH com IC₅₀ de 6,10 e 8,10 µg/mL respectivamente, semelhante estatisticamente ao padrão rutina utilizado e pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio com resultado de 60,19% para fração acetato de etila folha e 112,74 % para fração acetato de etila galho em relação ao padrão rutina e relacionado ao padrão vitamina C obtiveram 26,88% e 50,35% respectivamente. A toxicidade preliminar da *Myrsine parvula* foi avaliada frente à *Artemia salina* e células sanguíneas de carneiro. Houve ação moderadamente tóxica frente ao microcrustáceo em ordem decrescente pela fração clorofórmio da folha, extrato bruto folha, hexano folha, hexano galho e acetato de etila da folha. Nenhuma amostra apresentou atividade hemolítica. No ensaio alelopático foi determinado a interferência das amostras sobre a germinação e crescimento da *Lactuca sativa*. Todas as amostras avaliadas apresentaram potencial fitotóxico na redução do crescimento da radícula e hipocótilo na espécie utilizada como alvo, destacando a ação das frações clorofórmicas. O estudo revelou boa atividade antioxidante, alelopática e baixa toxicidade da *Myrsine parvula*.

Palavras-chave: Antioxidante. Flavonoides. Toxicidade. Morfoanatomia.

Primulaceae.

ABSTRACT

The aim of this work was to perform the phytochemical, morphoanatomic, allelopathic, preliminary toxicity and antioxidant activity of the crude extract and leaf and twig fractions of *Myrsine parvula* (Primulaceae), motivated by the scarcity of studies related to the species. Through phytochemical tests the presence of flavonoids, steroids / triterpenes, tannins, anthraquinones and iridoids was detected qualitatively. From the crude extract fractions were obtained by means of partitioning with solvents in an increasing scale of polarity: fraction hexane, chloroform, ethyl acetate and remainder. The ethyl acetate fraction of the leaf was submitted to analysis by the HPLC and subsequent confirmation of the constituents through Nuclear Magnetic Resonance (NMR), where phenolic compounds (gallic acid and rutin) were identified. The morphoanatomy of the leaf, petiole and twig of the species followed standard methodology of optical and electronic microscopy, with histochemical tests. Leaf blade showed striated and undulated cuticle, anisocytic stomata (being hypostomatic) and dorsiventral mesophyll. Cells secreting substances of lipophilic nature were observed in the leaf, petiole and twig, as well as the presence of phenolic compounds evidenced by ferric chloride. Starch and calcium oxalate druse on the petiole were detected. The antioxidant activity assays indicated good antioxidant capacity, with the ethyl acetate fractions of leaf and branch being reduced in the DPPH radical with IC₅₀ of 6.10 and 8.10 µg / mL, respectively, similar to the standard routine used and method of formation of the phosphomolybdenum complex with a result of 60.19% for ethyl acetate leaf fraction and 112.74% for ethyl acetate branch fraction in relation to the standard rutin and related to the vitamin C standard were 26.88% and 50.35%, respectively. The preliminary toxicity of *Myrsine parvula* was assessed against *Artemia salina* and sheep's blood cells. There was moderately toxic action against microcrustaceans in descending order by the chloroform fraction of the leaf, crude leaf extract, leaf hexane, twig hexane and leaf ethyl acetate. No sample had hemolytic activity. In the allelopathic assay the interference of the samples on the germination and growth of *Lactuca sativa* was determined. All the evaluated samples presented phytotoxic potential in the reduction of radicle and hypocotyl growth in the species used as target, highlighting the action of chloroform fractions. The study revealed good antioxidant, allelopathic activity and low toxicity of *Myrsine parvula*.

Keywords: Antioxidant. Flavonoids. Toxicity. Morphoanatomy. Primulaceae

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE <i>Myrsine parvula</i> NO BRASIL.....	30
FIGURA 2 –	ILUSTRAÇÃO DO FORMATO DA <i>Myrsine parvula</i> .E SUA EXSICATA COLETADA EM CURITIBA/PR.....	31
FIGURA 3 –	REGISTRO DA EXSICATA DE <i>Myrsine parvula</i>	36
FIGURA 4 –	FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	37
FIGURA 5 –	ESTRUTURA QUÍMICA DE ESTERÓIDE E/OU TRITERPENOS....	57
FIGURA 6 –	CROMATOGRAMA OBTIDO DO EXTRATO BRUTO DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i> POR MEIO DA CLAE EM 277 NM	61
FIGURA 7 –	CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA FOLHA DA <i>Myrsine parvula</i> POR CLAE.....	62
FIGURA 8 –	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA FOLHA DE <i>Myrsine parvula</i>	63
FIGURA 9 –	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA FOLHA DE <i>Myrsine parvula</i>	63
FIGURA 10 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO E RUTINA.....	66
FIGURA 11 –	FOLHAS SECAS DA <i>Myrsine parvula</i>	67
FIGURA 12 –	VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA <i>Myrsine parvula</i>	68
FIGURA 13 –	SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DA FOLHA DA ESPÉCIE EM ESTUDO.....	70
FIGURA 14 –	SECÇÃO TRANSVERSAL E ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO PÉCÍOLO DE <i>Myrsine parvula</i>	72
FIGURA 15 –	SECÇÃO TRANSVERSAL E ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	73
FIGURA 16 –	DETALHES DO GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	74

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA <i>Myrsine parvula</i>	29
QUADRO 2 –	GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD.....	46
QUADRO 3 –	ENSAIOS HISTOQUÍMICOS REALIZADOS NA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	47
QUADRO 4 –	PREPARO DAS AMOSTRAS NO ENSAIO DPPH.....	49
QUADRO 5 –	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO HEMOLÍTICO..	52

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	80
GRÁFICO 2 –	CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	85
GRÁFICO 3 –	CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA <i>Lactuca sativa</i> FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANTIOXIDANTES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA PRIMULACEAE.....	24
TABELA 2 –	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Myrsine</i>	28
TABELA 3 –	TEOR DE UMIDADE OBTIDOS NAS FOLHAS E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	55
TABELA 4 -	TEOR DE CINZAS TOTAIS OBSERVADO NAS FOLHAS E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	55
TABELA 5 –	RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	56
TABELA 6 –	RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	58
TABELA 7 –	RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	59
TABELA 8 –	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	60
TABELA 9 –	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA DA ROTINA.....	64
TABELA 10 –	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA DO ÁCIDO GÁLICO.....	64
TABELA 11 –	FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	75
TABELA 12 –	RESULTADO DA REDUÇÃO DE 50% DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA <i>Myrsine parvula</i>	76
TABELA 13 –	MORTALIDADE E CL ₅₀ DA <i>Artemia salina</i> FRENTE AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA <i>Myrsine parvula</i>	77

TABELA 14 –	PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO DA <i>Lactuca sativa</i> FRENTE À ESPÉCIE <i>Myrsine parvula</i>	81
TABELA 15 –	IVG DA <i>Lactuca sativa</i> FRENTE AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA <i>Myrsine parvula</i>	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

alt	–	Altura
ANOVA	–	Análise de variância
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
CLAE/DAD	–	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector fotodiodo
CL ₅₀	–	Concentração letal 50%
cm	–	Centímetro
compr	–	Comprimento
COX-1	–	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	–	Ciclo-oxigenase 2
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	–	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
FAA	–	Formol, ácido acético glacial, e álcool etílico a 70% (v/v)
FAE	–	Fração Acetato de Etila
FC	–	Fração Clorofórmio
FH	–	Fração Hexano
FEOH	–	Fração Hidroalcoólica
FR	–	Fração Remanescente
°GL	–	°Gay Lussac
H ₂ SO ₄	–	Ácido Sulfúrico
hnRNP-K	–	Ribonucleoproteína nuclear heterogênia K
HPLC	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBAMA	–	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IC ₅₀	–	Concentração inibitória 50%
IVG	–	Índice de Velocidade de Germinação
larg	–	Largura
KCl	–	Cloreto de Potássio
KOH	–	Hidróxido de Potássio
MEV	–	Microscopia eletrônica de varredura
MHz	–	Mega Hertz
m	–	Metro
mm	–	Milímetro
MMPs	–	Metaloproteinases
NaCl	–	Cloreto de Sódio
NaOH	–	Hidróxido de Sódio
Na ₂ HPO ₄	–	Fosfato Dissódico
NH ₄ OH	–	Hidróxido de Amônio
nm	–	Nanômetro
PBS	–	Tampão Fosfato Salino
pH	–	Potencial hidrogeniônico
RMN	–	Ressonância magnética nuclear
RPM	–	Rotação por minuto
TACE	–	Enzima conversora do TNF
TMS	–	Tetrametilsilano
TNF alfa	–	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPA	–	12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato
VEGF	–	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo geral	20
1.1.2	Objetivos específicos.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	FAMÍLIA PRIMULACEAE.....	22
2.2	GÊNERO <i>Myrsine</i> L.	25
2.3	PLANTA <i>Myrsine parvula</i> (MEZ) OTEGUI.....	29
2.4	MORFOANATOMIA	31
2.5	PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES VEGETAIS	32
2.6	TOXICIDADE	33
2.7	ALELOPATIA	34
3	METODOLOGIA	36
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	36
3.2	ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS	37
3.2.1	Umidade	37
3.2.2	Cinzas totais.....	38
3.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	38
3.3.1	Extrato hidroalcoólico e fracionamento da <i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui.....	38
3.3.1.1	Pesquisa de alcaloides.....	39
3.3.1.2	Pesquisa de leucoantocianidinas	39
3.3.1.3	Pesquisa de heterosídeo flavônico.....	40
3.3.1.4	Pesquisa de flavonóis.....	40
3.3.1.5	Pesquisa de cumarinas	40

3.3.1.6 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos	40
3.3.1.7 Pesquisa de esteroides e triterpenos	41
3.3.1.8 Pesquisa de iridóides	41
3.3.2 Preparo do extrato aquoso da <i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui	42
3.3.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos	42
3.3.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	42
3.3.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	42
3.3.2.4 Pesquisa de taninos	43
3.3.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis	43
3.3.2.6 Pesquisa de ácidos fixos	43
3.3.2.7 Pesquisa de amino grupo	44
3.4 EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA	44
3.4.1 Obtenção do extrato bruto	44
3.4.1.1 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto	44
3.4.2 Fracionamento do extrato bruto	45
3.4.3 Caracterização dos Compostos	45
3.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO	46
3.5.1 Preparo da lâmina	47
3.5.1.1 Diafanização ou clareamento	47
3.5.1.2 Lâminas semipermanentes	47
3.5.2 Teste histoquímico	47
3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura	48
3.6 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	48
3.6.1 Formação do complexo fosfomolibdênio	48
3.6.2 Ensaio antioxidante por redução do radical DPPH	49
3.7 TOXICIDADE <i>in vitro</i>	50
3.7.1 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	50

3.7.2 Atividade hemolítica	51
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	53
3.8.1 Teste de germinação.....	53
3.8.2 Teste de crescimento	54
3.8.3 Análise estatística	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS	55
4.1.1 Umidade	55
4.1.2 Cinzas totais.....	55
4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	56
4.2.1 Extrato hidroalcoólico e frações da <i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui.....	56
4.2.2 Extrato aquoso da <i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui	58
4.3 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES.....	59
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	60
4.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO	67
4.6 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	75
4.6.1 Formação do complexo fosfomolibdênio	75
4.6.2 Redução do radical DPPH.....	76
4.7 TOXICIDADE <i>in vitro</i>	77
4.7.1 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	77
4.7.2 Atividade hemolítica	79
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	81
4.8.1 Germinação e Índice de Velocidade de Germinação (IVG)	81
4.8.2 Crescimento	84
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO 1 AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO.....	101

1 INTRODUÇÃO

Estudos voltados a produtos naturais têm aumentado e se diversificado no século XXI. Nos últimos 15 anos a pesquisa avançou e se revelou promissora, mas em contrapartida o desmatamento da flora brasileira tem levado à extinção de muitas espécies, inclusive as que ainda nem sequer foram estudadas (BERLINCK, 2017). Dados divulgados pela Fundação SOS Mata Atlântica e pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2016), mostram que o desmatamento cresceu 1% nos remanescentes florestais da Floresta Atlântica no território nacional em relação aos dados obtidos em 2013-2014, e o estado do Paraná apresentou o índice mais elevado com alta de 116% principalmente nas florestas com Araucária.

Ainda que os estudos tenham aumentado, devido à biodiversidade brasileira e ao crescente número de pesquisadores da química de produtos naturais, muitas plantas ainda não são conhecidas, tampouco estudadas, fazendo com que se percam possibilidades de aumentar o arsenal terapêutico em diversidade e quantidade, pela falta de descobertas de novos compostos obtidos da pesquisa com essas plantas. (BERLINCK, 2017; CAMPOS, 2014).

Há uma busca por novos compostos que atuem no combate a doenças que acometem diversos países. O avanço nas pesquisas com produtos naturais permitiu que fenômenos mais complexos associados à biologia celular e molecular e a eletrofisiologia fossem elucidados e posteriormente identificados, isolados e clonados. (ASSAD, 2010; CALIXTO, 2003).

A espécie em estudo, *Myrsine parvula* (Mez) Otegui é uma Primulaceae encontrada na forma de arvoretas predominantemente nas regiões sul e sudeste do Brasil. É uma planta pouco estudada do gênero *Myrsine*, popularmente conhecida como Capororoca. (FREITAS; KINOSHITA, 2015).

Dentre as espécies já estudadas desta família, alguns pesquisadores puderam referir atividades químicas e biológicas diversas. Foram descritas atividades analgésicas, anti-inflamatórias, antioxidante (MAHENDRAN et al., 2011), anti-tumoral (SULAIMAN et al., 2011), antifúngica, citotóxica (KARIMI; JAAFAR; AHMAD, 2013), anti-diabética (NAIK et al., 2013), hepatoprotetora (ROOME et al., 2008). No gênero *Myrsine*, atividade antimicrobiana (BURGER et al., 2015), anti-inflamatória

(MIZUSHINA et al., 2000), tripanocida (LEITE et al., 2009), herbicida/alelopática (NOVAES et al., 2013), antioxidante (MIRANDA, 2015), entre outras.

Tais estudos sugerem, portanto, que a análise das atividades biológicas (atividade alelopática, ensaios de toxicidade), atividades antioxidantes, o estudo morfoanatômico e a pesquisa fitoquímica dessa espécie são interessantes para possível detecção de compostos e aplicabilidade no combate a doenças.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a planta *Myrsine parvula* (Mez) Otegui quanto a sua composição fitoquímica, toxicidade, características morfoanatômicas, propriedades antioxidantes e alelopáticas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar levantamento na literatura da espécie *Myrsine parvula* (Mez) Otegui, do gênero *Myrsine* e família Primulaceae;
- Depositar a exsicata da planta e solicitar autorização de pesquisa junto ao IBAMA;
- Realizar análise fitoquímica da folha e galho da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui;
- Produzir o extrato bruto e frações da folha e galho da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui;
- Isolar os compostos observados na análise fitoquímica da folha e galho da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui através de métodos cromatográficos;
- Identificar os compostos detectados por meio de RMN (Ressonância Magnética Nuclear);
- Realizar o estudo morfoanatômico da folha e galho da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui;
- Avaliar nos extratos brutos e frações da folha e galho da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui:
 - Atividade antioxidante *in vitro*;

- Toxicidade *in vitro* frente à *Artemia salina*;
- Atividade hemolítica;
- Efeitos alelopáticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA PRIMULACEAE

A família Primulaceae, que possui como sinônimo Myrsinaceae, é formada por plantas angiospermas, encontradas na forma de arbustos, árvores, ervas e subarbustos. Segundo Stahl e Anderberg (2004) há 49 gêneros e 1500 espécies dentro desta família no mundo.

No Brasil 11 gêneros são identificados e são eles: *Ardisia* Sw., *Clavija* Ruiz & Pav., *Ctenardisia* Ducke, *Cybianthus* Mart., *Geissanthus* Hook.f., *Jacquinia* L., *Lysimachia* L., *Myrsine* L., *Parathesis* (A.DC.) Hook.f., *Samolus* L., *Stylogyne* A.DC, além de outros 7 sinônimos. Em relação às espécies 140 são aceitas e há 144 sinônimos. (FREITAS; CARRIJO, 2015).

Dentre as espécies que fazem parte desta família, algumas se destacam por seu uso e suas propriedades biológicas:

Por exemplo, a decocção aquosa da raiz ou da planta inteira da *Labisia pumila* (Blume) Mez. pertencente à medicina popular da Malásia, é usada há 400 anos pelas mulheres para auxiliar na indução e facilitação do trabalho de parto, contribuir na recuperação do corpo pós-parto, no tratamento da infertilidade, disenterias, flatulências e gonorreia. E ainda algumas atividades foram apresentadas por estudos científicos: ação antibacteriana, antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória. Na Malásia são comercializadas cápsulas do extrato desta planta, com o nome comercial Kacip Fatimah, indicada como suplemento nutricional e potencializador de libido feminino. (ALADDIN et al., 2016).

A *Lysimachia christinae* Hance é uma planta usada na China para tratar hepatites virais e colecistite. Com base no seu uso popular um estudo foi realizado, avaliando a capacidade do seu extrato etanólico, juntamente com seu composto isolado (quercetina) de impedir a destruição do equilíbrio das células oxidantes e antioxidantes provocadas pelo estresse oxidativo, induzido pela administração oral de álcool em camundongos. A espécie apresentou atividade hepatoprotetora, sendo a quercetina o principal composto com este potencial de ação. O mecanismo de proteção contra a lesão hepática nesse caso está relacionado à inibição do estresse oxidativo. (WANG et al., 2012).

A espécie *Lysimachia clethroides* Duby apresentou atividade anti-inflamatória. Esta espécie já é muito usada na medicina tradicional chinesa e demais países asiáticos para o tratamento de edemas, hepatite e doenças inflamatórias. No estudo feito com o extrato metanólico desta planta se observou a atenuação da inflamação (provocada por um macrófago marcado por lipopolissacarídeo em camundongos) referente à sua capacidade de regular os mecanismos-chaves do processo inflamatório, reduzindo a infiltração de neutrófilos e a produção da interleucina 6. (SHIM et al., 2013).

As espécies *Anagallis arvensis* L. e *Anagallis foemina* Mill. plantas tradicionalmente usadas em Navarra na Espanha, para tratamentos dermatológicos (cura de feridas) tiveram seus extratos aquosos e metanólicos avaliados separadamente quanto às suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Os extratos metanólicos de ambas as espécies inibiram o crescimento dos microrganismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Já no ensaio de atividade anti-inflamatória, tanto os extratos aquosos quanto os metanólicos inibiram as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), porém nas concentrações de 0,1 e 1 mg/mL os extratos metanólicos das duas espécies apresentaram resultado significativo na inibição das enzimas, diminuindo a produção de prostaglandinas. Os extratos aquosos de ambas as plantas demonstraram atividade antioxidante. Por ensaio de CCD (cromatografia em camada delgada) foram detectados saponinas e flavonoides, os quais foram correlacionados com as atividades evidenciadas pelas plantas. (LOPES et al., 2011).

Utilizada na medicina tradicional do Irã para prevenir doenças oculares (cegueira e catarata), a *Primula auriculata* L. apresentou potencial ação antimicrobiana frente às bactérias *Proteus vulgaris* e *Bacillus cereus*, e atividade antioxidante significativa. Na análise fitoquímica da planta foram detectados saponinas, flavonoides, glucosinolatos e compostos fenólicos, podendo ser estes os responsáveis pelas ações demonstradas. (JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013).

Há ainda artigos que relatam a ação de saponinas triterpênicas na atenuação de células cancerígenas. O isolado desglucoanagalloside B (saponosídeo) da espécie *Lysimachia ciliata* L., demonstrou seletividade e especificidade sobre as células cancerosas da próstata, indicando potencial para uso em terapias de quimioprevenção. (KOCZURKIEWICZ et al., 2013).

Extratos etanólicos de duas espécies do gênero *Cyclamen* (*Cyclamen mirabile* Hildbr. e *Cyclamen alpinum* Dammann ex Spreng.), foram analisados frente ao mosquito *Culex pipiens* (vetor de vírus resistente a muitos inseticidas) quanto sua ação larvicida. No ensaio foi observado que os estádios larvais jovens são mais suscetíveis aos extratos quando comparados aos estádios larvais adultos, sendo o *Cyclamen mirabile* Hildbr. a espécie mais ativa. (OZ et al., 2013).

A Embelina é uma quinona encontrada no fruto da *Embelia ribes* Burm (Myrsinaceae) que possui atividade anti-inflamatória por reduzir a ação do fator de necrose tumoral, o TNF- alfa. A espécie também demonstrou ser um potente inibidor da enzima de conversão do TNF-alfa, a TACE. Além disso, apresentou inativação de moléculas sinalizadoras de metástase como MMPs (metaloproteinases), VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) e hnRNP-K (ribonucleoproteína nuclear heterogênia K) em células de câncer de mama, sendo promissora para efeito anti-tumoral. (DHANJAL J.K. et al., 2014). A Embelina ainda atuou na redução do perfil lipídico, melhoria do estresse oxidativo e no auxílio do tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2, inibindo mediadores pró-inflamatórios intracelulares. (NAIK et al., 2013).

Extratos etanólicos das espécies *Maesa ambigua* C.Y. Wu & C. Chen, *M. brevipaniculata* Pipoly & C. Chen, *M. perlaria* (Lour.) Merr. e os extratos n-butanólicos da *M. argentea* (Wall.) A. DC., e *M. japônica* (Thunb.) Moritzi & Zoll. apresentaram resultado positivo para saponinas por meio de CCD e a presença das mesmas foi relacionada à atividade antileishmaniose. (FOUBERT et al., 2009).

Atividades promissoras foram identificadas no levantamento da literatura referente à família Primulaceae. A TABELA 1 exemplifica as atividades biológicas das diferentes espécies desta família.

TABELA 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANTIOXIDANTES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA PRIMULACEAE

(continua)

Espécie	Atividade	Referência
<i>Labisia pumila</i> (Blume) Mez	Antibacteriana, antioxidante, antifúngica e anti-inflamatória	ALLADIN et al, 2016
<i>Lysimachia christinae</i> Hance	Hepatoprotetora	WANG et al, 2012
<i>Anagallis arvensis</i> L. e <i>Anagallis foemina</i> Mill.	Antimicrobiana e anti-inflamatória	LOPES et al, 2011
<i>Lysimachia clethroides</i> Duby	Anti-inflamatória	SHIM et al, 2013
<i>Primula auriculata</i> L.	Antimicrobiana e antioxidante	JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013

TABELA 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANTIOXIDANTES DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA PRIMULACEAE

(conclusão)

Espécie	Atividade	Referência
<i>Lysimachia cilata</i>	Anti-tumoral	KOCZURKIEWICZ et al, 2013
<i>Embelia ribes</i> Burm	Anti-inflamatória e anti- tumoral	DHANJAL et al, 2014
<i>Maesa ambigua</i> , <i>M. brevipaniculata</i> , <i>M. perlarius</i> , <i>M. argentea</i> e <i>M. japonica</i>	Antileishmaniose	FOUBERT et al, 2009

FONTE: O autor (2017)

2.2 GÊNERO *Myrsine* L.

O gênero *Myrsine* L. pertence à subfamília Myrsinoideae da família Myrsinaceae/Primulaceae. Este gênero possui o sinônimo *Rapanea*, porém nem sempre foi aceito. Embora diversas publicações tenham sido feitas revalidando o gênero *Rapanea*, por muito tempo a maioria dos autores seguiram Mez (1902) que relatou serem gêneros distintos, devido às características específicas do androceu. De acordo com Freitas (2003), no entanto, essas diferenças no androceu não são significativas para separar os gêneros, e sim seriam possíveis estádios de evolução dos mesmos. Além das características do androceu, a inflorescência umbeliforme e informações palinológicas também defendem o fato de serem considerados sinônimos.

Para identificar as espécies deste gênero, há algumas características específicas como a presença de indumento nos ramos, a forma e a dimensão das folhas, a distribuição, tipo e ocorrência de estruturas secretoras nas folhas. A coloração da casca interna pode auxiliar na diferenciação das espécies do gênero. Outra característica do gênero é o habitat, onde as espécies preferem ambientes abertos e florestas semidecíduas. São férteis o ano todo, com a frutificação mais prolongada que a floração. (FREITAS, 2003). Possui uma distribuição pantropical, com representantes arbóreos. (BAUER, 2012).

Mez (1902) citou 136 espécies de *Rapanea* e 2 do gênero *Myrsine* L., no Brasil 27 foram mencionadas. Já Mabberley (1987) relatou haver 300 espécies de *Myrsine* L. no mundo.

De acordo com o estudo publicado por Freitas e Kinoshita (2015) nas regiões Sul e Sudeste do Brasil foram registradas 23 espécies de *Myrsine* L. e 26 espécies

encontradas na Flora Brasileira até o momento, podendo elevar esse número por meio de estudos nas regiões Norte e Nordeste do país.

No Brasil as espécies do gênero *Myrsine* L. são conhecidas popularmente como “Capororoca”, “Pororoca” e “Caapororoca”. Este gênero foi descrito botanicamente por Linnaeus em 1753 como arbustos ou arvoretas com estruturas secretoras internas globóides ou lineares nas folhas, flores e frutos; ramos pilosos ou glabros. Folhas alternas, pecioladas ou sésseis, com tricomas glandulares. Inflorescências umbeliformes ou pequenos racemos, dispostas nos ramos terminais, pedúnculo com brácteas pilosas; multifloras. Flores unissexuadas, pedicelos glabros ou pilosos, bractéola única, actinomorfas, diclamídias, de 4 a 5 ou até 6 lobos obtusos ou arredondados, margem pilosa; androceu isostêmone, com estames ou estaminódios inseridos na base do tubo da corola ou sobre os lacínios, filetes livres ou conatos na base formando um pequeno tubo estaminal, este tubo com ou sem apêndices alternos aos filetes; anteras rimosas; conectivo com ou sem cavidades com secreção escura; ovário e pistilódio globosos, uniloculares; placentação central, globosa, óvulos imersos ou visíveis através de poros na placenta; estilete geralmente ausente; estigma cônico, 3-lobado. Frutos globosos a elípticos, drupáceos com o endocarpo esclerificado; semente globosa, única, com testa fina, restos da placenta persistentes; endosperma ósseo, liso ou ruminado; embrião reto com eixo longo, cilíndrico, transversais às sementes, e cotilédones foliáceos reduzidos. (FREITAS; KINOSHITA, 2015).

Dentre as atividades biológicas apresentadas por este gênero o extrato de *Rapanea parviflora* D. Legrand mostrou bom desempenho na atividade bactericida contra *Enterococcus faecalis*. (SUFFREDINI I. B.; VARELLA A. D.; YOUNES R. N, 2007). Os extratos da espécie *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez também apresentaram boa atividade antibacteriana, sendo esta ação devida à presença de saponinas na planta. (MADIKIZELA et al., 2012).

O extrato metanólico bruto das partes aéreas da *Myrsine africana* L. demonstrou atividade antiespasmódica com probabilidade de ser por meio do bloqueio de canais de cálcio. (AZAM; BASHIR; AHMAD, 2011).

Na planta *Myrsine seguinii* H. Lév., foi purificado e isolado o ácido myrsinóico B, o qual apresentou ação inibidora da enzima metioninase, responsável pelo mau hálito provocado por bactérias periodontais. (ITO; NARISE; SHIMURA, 2008). O extrato metanólico da *Myrsine seguinii* H. Lév. possui ação anti-inflamatória, com três

compostos, sendo eles o ácido myrsinóico B, C e F. O ácido myrsinóico F demonstrou maior ação na supressão do edema induzido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, indutor de edema externo aplicado em ratos para avaliação da atividade anti-inflamatória). (HIROTA et al., 2002). A *Myrsine seguinii* H. Lév ainda apresenta compostos anti-inflamatórios e ação inibidora da DNA polimerase. Essa ação pode ser causada pelos ácidos terpeno-benzóicos. (MIZUSHINA et al., 2000).

Há potencial alelopático na *Myrsine guianensis* (Aubl.) Kuntze. Seu extrato aquoso foi analisado frente à germinação e crescimento de alface em placas de petri, contendo 20 sementes, permanecendo incubadas em B.O.D. por 96 horas. Diferenças significativas foram observadas na germinalidade do extrato aquoso preparado a frio e a quente quando comparados ao controle (água destilada), e no crescimento do hipocótilo. (SILVA; AQUILA, 2006).

O extrato orgânico (diclorometano 1:1 metanol) das partes aéreas da *Rapanea parviflora* A. DC. Mez foi avaliado quanto à ação de inibição *in vitro* da enzima tirosinase que está envolvida na melanogênese. Ao inibir essa enzima a planta contribui com a despigmentação dermatológica e assim pode atuar em tratamentos de casos de hiperpigmentação como melasma. Apresentou inibição de 50% da enzima com concentração de 64,19 µg/mL sendo considerado satisfatório e interessante para dar continuidade aos ensaios em órgãos mais complexos. (MACRINI et al., 2009).

A partir dos frutos da *Myrsine cuneifolia* foi isolado o composto ácido myrsinóico A. Após uma reação de hidrogenação catalítica foi obtido um derivado, o qual apresentou ação de inibição da fotossíntese *in vitro*. (BURGER et al., 2012).

A estrutura 13,28-epoxi-oleanano, uma saponina triterpenica foi isolada do extrato etanólico de raízes de duas espécies *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult. e *Myrsine andina* (Mez) Pipoly. O composto que continha um grupo aldeído em sua estrutura apresentou significativa atividade antitumoral indicando ser esse grupo aldeído o responsável pela função citotóxica apresentada. (GIRARDI et al., 2012).

Foi avaliado a ação tripanocida dos extratos hexano, diclorometano e metanol das espécies *Rapanea lancifolia* (Mart.) Mez, *R. guianensis* Aubl., *R. umbelata* (Mart.) Mez (Myrsinaceae) e *Cipadessa fruticosa* Blume (Meliaceae). O extrato hexano dos

ramos da *Rapanea lancifolia* (Mart.) Mez apresentou alta atividade sem afetar as células vermelhas do sangue. (LEITE et al., 2010).

No extrato aquoso da folha de *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez foi detectada atividade alelopática sobre a germinação e crescimento de plantas invasoras (capim-arroz, amendoim-bravo e corda-de-viola), caracterizando potencial atividade herbicida quando comparado ao padrão oxifluorfem (herbicida sintético). Os resultados demonstraram inúmeras anomalias na anatomia da radícula das plantas infestantes. No crescimento da parte aérea, o padrão apresentou maior efeito do que o extrato, porém o comprimento da parte radicular foi mais afetado pelo extrato do que pelo herbicida, indicando, portanto, uma atividade promissora como herbicida natural. (NOVAES et al., 2013).

A planta *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult é caracterizada pela presença de alquilbenzoquinonas e triterpenóides. Foi realizado o teste *in vitro* da atividade antimicrobiana do ácido myrsinóico A, extraído dos frutos dessa espécie, e seus derivados. Esse ácido foi submetido a uma hidrogenação catalítica e reações de acetilação, obtendo dois derivados. O ácido myrsinóico não apresentou resposta contra os microorganismos testados, enquanto os compostos derivados apresentaram atividades antimicrobianas contra o *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses resultados indicam que a estrutura do composto interfere na ação antimicrobiana. Neste caso o grupo éster do derivado que foi acetilado apresentou bons resultados, sugerindo que são necessários mais estudos com esses compostos. (BURGER et al., 2015).

A TABELA 2 resume as atividades biológicas encontradas para este gênero.

TABELA 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Myrsine*.

(continua)

Espécie	Atividade	Referência
<i>Rapanea parviflora</i> <i>Rapanea melanophloeos</i> <i>Myrsine coriacea</i>	Antimicrobiana	SUFFREDINI I. B.; VARELLA A. D.; YOUNES R. N, 2007 MADIKIZELA et al., 2012 BURGER et al., 2015
<i>Myrsine africana</i>	Antiespasmódica	AZAM; BASHIR; AHMAD, 2011
<i>Myrsine seguinii</i>	Anti-inflamatória	HIROTA et al., 2002
<i>Myrsine guianensis</i> <i>Rapanea umbellata</i>	Alelopática	SILVA; AQUILA, 2006 NOVAES et al., 2013
<i>Rapanea parviflora</i>	Despigmentação dermatológica	MACRINI et al., 2009

TABELA 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Myrsine*.

(conclusão)

<i>Myrsine cuneifolia</i>	Inibição da fotossíntese <i>in vitro</i>	BURGER et al., 2012
<i>Myrsine coriacea</i> e <i>Myrsine andina</i>	Antitumoral	GIRARDI et al., 2012
<i>Rapanea lancifolia</i> , <i>R. guianensis</i> , <i>R. umbelata</i>	Tripanocida	LEITE et al., 2010

FONTE: O autor (2017)

2.3 ESPÉCIE *Myrsine parvula* (MEZ) OTEGUI

O enquadramento taxonômico da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui está representado no QUADRO 1.

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA *Myrsine parvula*

Espécie	<i>Myrsine parvula</i> (Mez) Otegui
Gênero	<i>Myrsine</i> L.
Família	Primulaceae Batsch ex Borkh
Ordem	Ericales Bercht. & J. Presl
Super ordem	Asteranae Takht
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht
Classe	Equisetopsida C. Agardh

FONTE: TROPICOS (2016).

Uma chave para identificação da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui são suas folhas elíptico-lanceoladas, pecíolos 5–7 mm comprimento, flores pentâmeras e pedicelos 2,5–4mm comprimento. (FREITAS, 2003).

A *Myrsine parvula* (Mez) Otegui possui a seguinte descrição botânica:

Arvoretas 3–5(12) m alt., ramos terminais ca. 1,6 mm diâmetro, glabros. Folhas membranáceas a cartáceas, glabras, lisas, elípticas a lanceoladas, ápice agudo a acuminado, base aguda, levemente revoluta na face abaxial, 5–8(9) cm compr., (1,5)2–2,5(3) cm larg., margem inteira, levemente revoluta, nervura mediana proeminente em ambas as faces, na face inferior com 0,7–1 mm largura na base foliar, linhas translúcidas elípticas densas, com conteúdo escuro quando desidratadas, evidentes em folhas jovens e adultas, nervuras secundárias não impressas na face abaxial, pouco evidentes no material desidratado; pecíolo alvo-esverdeado, (4)5–7 mm compr. Inflorescências esparsas nos ramos, pedúnculo curto, 1–2 mm compr., 5–8 flores; bractéolas 1 mm compr., triangulares, tricomas curtos.

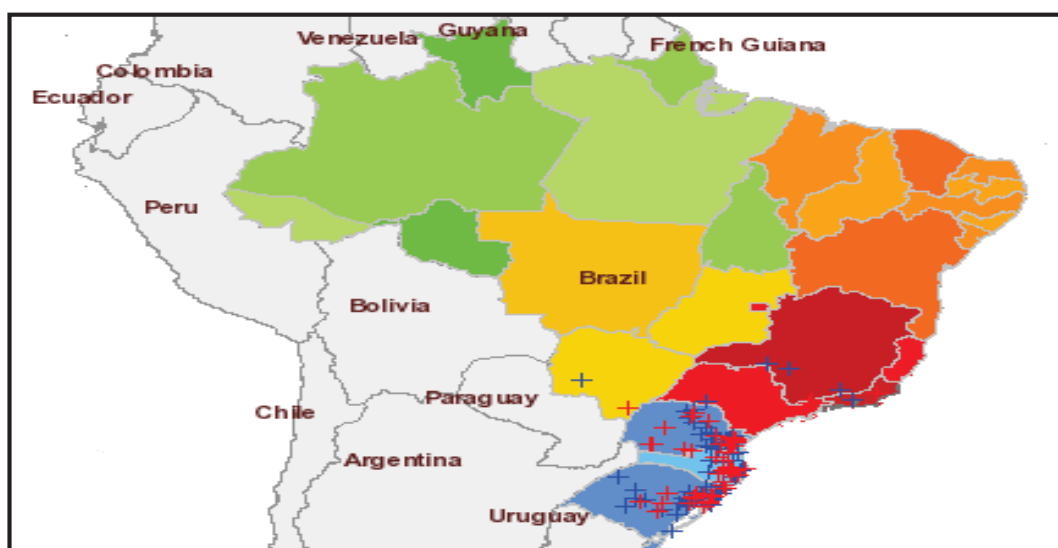
Flores pentâmeras, 6–7 mm compr.; pedicelos (2,5)3–4mm compr.; sépalas 1 mm compr., triangulares, tricomas curtos, esparsos, cavidades secretoras globosas ou ausentes; pétalas 2,5–3 mm compr., 1 mm larg., lanceoladas, cavidades secretoras globosas e lineares; estames 2 mm compr., estaminódios 1 mm compr., filetes conatos, apêndices do tubo estaminal ausentes; ovário globoso 1 mm compr., 1 mm larg., pistilódio cônico 1 mm compr.; estigma 1 mm. Fruto globoso, 4–6 mm compr., 3 mm larg., pericarpo do fruto imaturo verde, poucas cavidades secretoras. (FREITAS, M.F.; KINOSHITA, L.S., 2015, p. 182).

É uma espécie que está muito próxima da *Myrsine loefgrenii* (Mez) Imkhan. se diferenciando na presença de folhas, pedicelos e frutos maiores. (FREITAS, 2003).

Quando é desidratada, a parte abaxial da folha se torna acinzentada, evidenciando as densas cavidades secretoras que apresentam conteúdos escuros. No Brasil já foi encontrada do Espírito Santo ao Rio Grande do Sul, e também no Mato Grosso do Sul, como ilustrado na FIGURA 1. No Uruguai, Argentina e nordeste do Paraguai também houve ocorrência. (FREITAS, M. F. de.; KINOSHITA, L. S., 2015).

Os sinônimos dessa espécie até o momento são a *Myrsine floribunda* Griseb, *Myrsine lorentziana* (Mez) Arechav, *Rapanea lorentziana* (Mez), *Rapanea lorentziana* var. *intermedia* Hassl, *Rapanea megapotamica* Mez, *Rapanea parvula* Mez. (THE PLANT LIST, 2013).

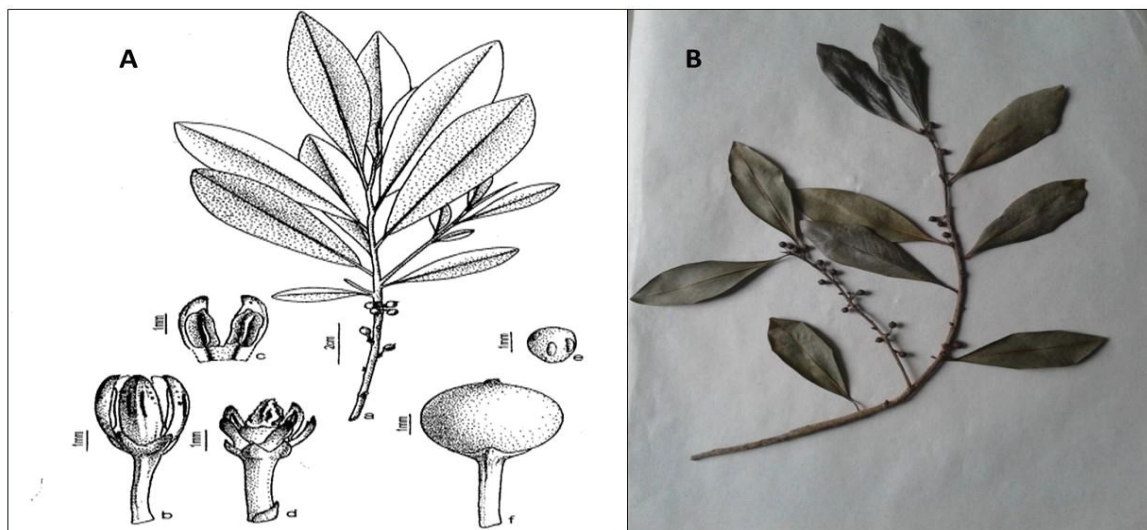
FIGURA 1 – OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE *Myrsine parvula* NO BRASIL.



FONTE: CRIA SPECIES LINK (2016) <<http://www.splink.org.br/index?lang=pt>>

A FIGURA 2 ilustra os detalhes da planta *Myrsine parvula* (painel A) e a exsicata da espécie coletada no painel B.

FIGURA 2 – ILUSTRAÇÃO DO FORMATO DA *Myrsine parvula*.E SUA EXSICATA COLETADA EM CURITIBA/PR



PAINEL A - FONTE: FREITAS (2003).

LEGENDA: a) ramo com frutos, b) flor masculina, c) detalhe da inserção dos estames, d) flor feminina em formação de fruto, e) placenta, f) fruto.

PAINEL B - FONTE: O autor (2016)

DESCRIÇÃO DA FIGURA: Planta delicada com ramos finos, folhas membranáceas de coloração verde acinzentada quando seca, frutos pequenos.

2.4 MORFOANATOMIA

O estudo morfoanatômico da planta é importante pois confere autenticidade à espécie e auxilia na sua classificação botânica dentro de um gênero/família, bem como permite a resolução de possíveis problemas filogenéticos e taxonômicos. (STUESSY 1991; FARIAS,2003). A análise anatômica e morfológica identifica as características microscópicas e macroscópicas do material vegetal, permitindo diferenciar uma espécie da outra. (SIEBERT, 2004; FIUZA, 2010). Já os testes microquímicos são fundamentais para contribuir na identificação de compostos químicos e em quais órgãos se encontram na espécie. (LUSA, 2010).

Uma característica observada por meio do estudo morfoanatômico são as cavidades secretoras que distinguem dois grupos dentro da família Primulaceae, o das espécies sem (subfamília Primuloideae) e as espécies com cavidades secretoras (subfamília Myrsinoideae). Dentro das espécies que possuem há uma variação da

composição de hidrogenoquinona, sendo este composto considerado um caracter quimiotaxonômico para separação de gênero. (LUNA et al, 2014).

2.5 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES VEGETAIS

O organismo humano é formado por um complexo sistema de defesas antioxidantes divididos pela ação de enzimas naturais e as não enzimáticas que combatem a atividade nociva de radicais livres e outros oxidantes. (ALAM et al 2012). Enzimas do ciclo redox da glutatona, a superóxido dismutase e a catalase são exemplos de enzimas naturais. (JÚNIOR et al., 2001). No sistema não enzimático temos o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), o ácido lipóico, os flavonoides, os carotenóides, entre outros. (BARREIROS; DAVID, DAVID, 2006).

Os radicais livres podem ocasionar diversas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, distúrbios neurais, doença de Parkinson, doença hepática induzida pelo álcool, aterosclerose, câncer e causar o envelhecimento. (ALAM et al 2012). O consumo de antioxidantes naturais pode ser de grande importância para a prevenção destas doenças, como os compostos fenólicos presentes nas plantas, que podem inibir a formação de radicais livres. (MORAIS et al, 2009).

Algumas plantas já são conhecidas pela sua ação antioxidante, como por exemplo, o alecrim, a sálvia, o manjeriço, as frutas cítricas, a uva, entre outras, devido a presença de compostos fenólicos como os flavonoides, taninos e tocoferóis. (ANGELO; JORGE, 2007).

Diferentes ensaios *in vitro* podem ser realizados para avaliar o poder antioxidante de amostras de interesse, como por exemplo o teste da formação do complexo fosfomolibdênio e a redução do radical livre DPPH, os quais foram abordados neste trabalho. (ALVES et al, 2010).

A reação de formação do complexo fosfomolibdênio ocorre por meio da redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) em presença de substâncias com ação antioxidante, formando o complexo fosfato/molibdênio (V) em meio ácido, passando da coloração inicial amarela para a verde. Este método avalia a capacidade antioxidante de compostos lipofílicos e hidrofílicos. (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

O ensaio de redução do radical DPPH avalia a capacidade antioxidante de uma substância em sequestrar o radical DPPH, uma molécula denominada de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, caracterizada como um radical livre, estável devido a deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. De coloração violeta, sua banda de absorção em etanol é de aproximadamente 518 nm. (ALVES et al, 2010; MOLYNEUX et al, 2004).

O radical DPPH é capaz de aceitar um radical hidrogênio, tornando-se o difenil-picril-hidrazina. Nesta reação de redução do radical a coloração violeta passa a ser amarelo pálido com decréscimo da absorbância. (ALVES et al, 2010; MOLYNEUX et al, 2004). Este ensaio é considerado simples e rápido, e contribui na validação da análise de extratos de diferentes tipos de plantas, requerendo poucas quantidades de amostra e solventes. (PIRES et al, 2017).

2.6 TOXICIDADE

Segundo Tovar e Petzel (2009) o uso de plantas para tratamento de doenças pela população é algo natural, percebida como segura, eficaz e com baixo custo, sendo utilizada muitas vezes associada a medicamentos convencionais. Portanto a avaliação da toxicidade de plantas medicinais é de suma importância.

Os ensaios de toxicidade avaliam a segurança do uso das plantas, bem como extratos e insumos obtidos de produtos naturais, na medicina popular, analisando a capacidade do extrato em causar algum dano ou alteração fisiológica em células. Conhecendo desta forma o potencial toxicológico das espécies vegetais. (BEDNARCZUK et al, 2010; MORENO et al, 2017).

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada utilizado na alimentação de peixes, é amplamente empregado para avaliar a toxicidade preliminar de extratos de plantas, devido a fácil obtenção, rapidez e baixo custo. (MEYER et al, 1982). Extratos de plantas que apresentam alta toxicidade contra a *Artemia salina* sugerem potencial elevado para atividades biológicas. (AMARANTE, et al, 2011). Segundo Bose et al (2011) extratos de material vegetal que demonstram alta toxicidade contra o microcrustáceo testado podem apresentar atividade pesticida, antitumoral e antimicrobiana.

O ensaio de atividade hemolítica é considerado um indicador de toxicidade geral e de bioatividade, muito utilizado na investigação da ação de extratos de plantas sobre o sangue humano. (GANDHI; CHERIAN, 2000). A ação hemolítica apresentada por algumas plantas pode estar relacionada à presença de metabólitos secundários como os alcaloides, saponinas e flavonóides. (ASLAM et al, 2011).

2.7 ALELOPATIA

O termo alelopatia significa no grego *allelon*: de um para outro e *pathós*: sofrer, portanto o conceito descreve a influência de uma planta sobre a outra, seja prejudicando ou favorecendo o seu desenvolvimento. Esta ação é causada pelos aleloquímicos, oriundos do metabolismo secundário da planta, podendo ter ação direta ou indireta. Na direta eles se ligam à membrana ou penetram nas células da planta receptora atuando diretamente no seu metabolismo. A indireta provoca alterações nas propriedades do solo e alterações de populações e/ou atividade dos microorganismos. (FERREIRA, A. G.; AQUILA, M.E.A., 2000).

Os aleloquímicos podem afetar processos fisiológicos das plantas, interferindo na divisão e alongamento celular, respiração, estrutura da membrana celular, na fotossíntese, na absorção de nutrientes minerais, na síntese de proteínas, lipídeos e ácidos graxos, entre outros. (PEREIRA, 2017).

O conhecimento das reações alelopáticas das plantas pode auxiliar na produção agrícola, contribuindo para a melhoria e busca por novos herbicidas. A utilização de sementes de plantas daninhas em bioensaios de alelopatia implica no uso dos aleloquímicos como possíveis herbicidas, porém o uso de outras sementes de culturas comerciais sugere um modelo mais amplo, principalmente em relação a efeitos estimulantes. (ALBUQUERQUE, 2011; MACIAS et al, 2000).

A semente de *Lactuca sativa* L. (alface) é muito utilizada em ensaios de alelopatia pois requer período de tempo curto para germinar e crescer, além da sua alta sensibilidade, não necessita ser manipulada, por se tratar de uma semente pequena, a mesma possui grande superfície de contato com o meio que se encontra. (ELAKOVICH, 1999; MACIAS et al, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001).

A avaliação do percentual de germinação das sementes auxilia na determinação da atividade inibidora ou estimulante dos extratos. Na literatura há relatos de que a

germinação é considerada menos sensível aos aleloquímicos quando comparada aos ensaios de crescimento da planta, devido ao processo de germinação utilizar as reservas da própria semente. (BARATELLI, T.G., 2006; AQUILA, M.E.A., 2000).

O ensaio do IVG (Índice de Velocidade de Germinação) é usado para avaliar o vigor das sementes (MAGUIRE, 1962), pois seu enfraquecimento causa perda progressiva na capacidade produtiva, com a redução na uniformidade da germinação (PIÑA-RODRIGUEZ et al., 2004).

O processo de crescimento é mais sensível aos aleloquímicos quando comparados à germinação da plântula, apresentando anormalidades no crescimento, sendo a necrose da radícula a mais comum. (FERREIRA, A. G.; AQUILA, M.E.A., 2000).

O crescimento da radícula e hipocótilo são medidas indiretas de processos fisiológicos que foram afetados pelas interações químicas. São partes vitais da semente pois originam a raiz e o galho da planta. (DIAS, 2005).

A maior diversidade de aleloquímicos podem ser encontrados nas folhas, possivelmente por ser um órgão metabolicamente mais ativo nas plantas. (RIBEIRO, 2009). Relacionado a essa maior concentração nas folhas, algumas espécies apresentam uma atividade alelopáticas maior no hipocótilo do que na radícula. (MAOMERI, KHALALI e TAVILI, 2011).

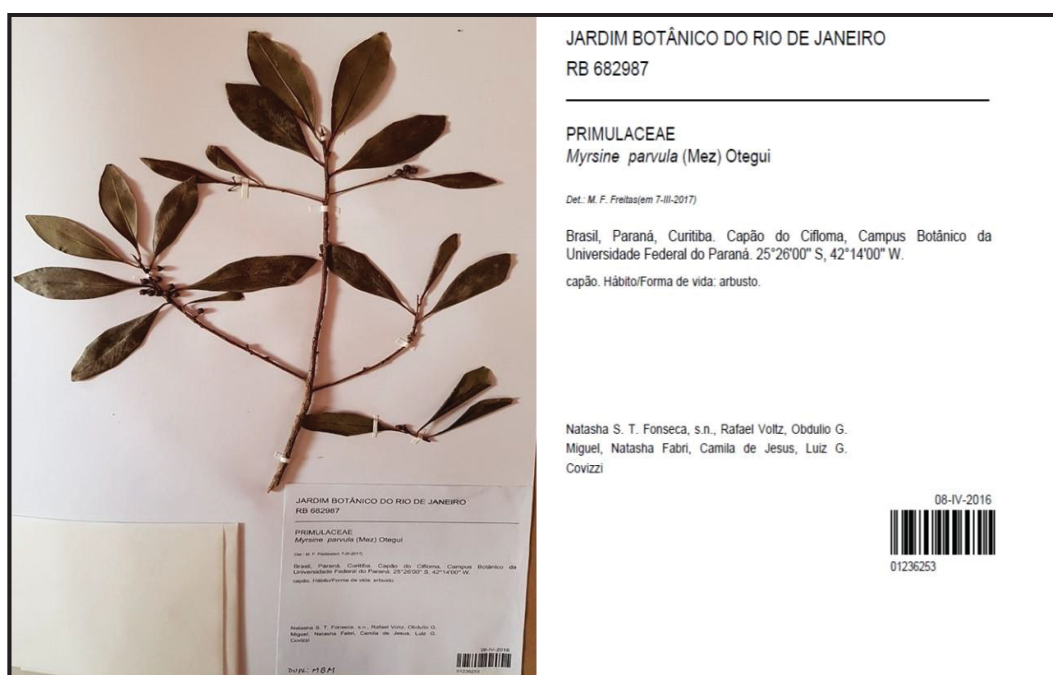
3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

A coleta do material foi realizada em abril de 2016 no Capão do Cifloma – Campus Botânico da UFPR, na cidade de Curitiba – PR com as coordenadas geográficas 25°26's/49°14'w. Foram coletados 7,425 kg das partes aéreas da planta, submetidas à triagem, separando-se galho e folhas, posteriormente foram secas à temperatura ambiente e protegidas da luz solar e trituradas em moinho de facas e martelo para a posterior preparação dos extratos.

A exsicata foi preparada logo após a coleta, identificada pela especialista no gênero Maria de Fátima de Freitas, e depositada no Herbário RB, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob o registro RB 682987 conforme a FIGURA 3. A espécie possui autorização de acesso ao patrimônio genético, expedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) sob o processo de nº 002001.001165/2013-47, intitulado “Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais”.

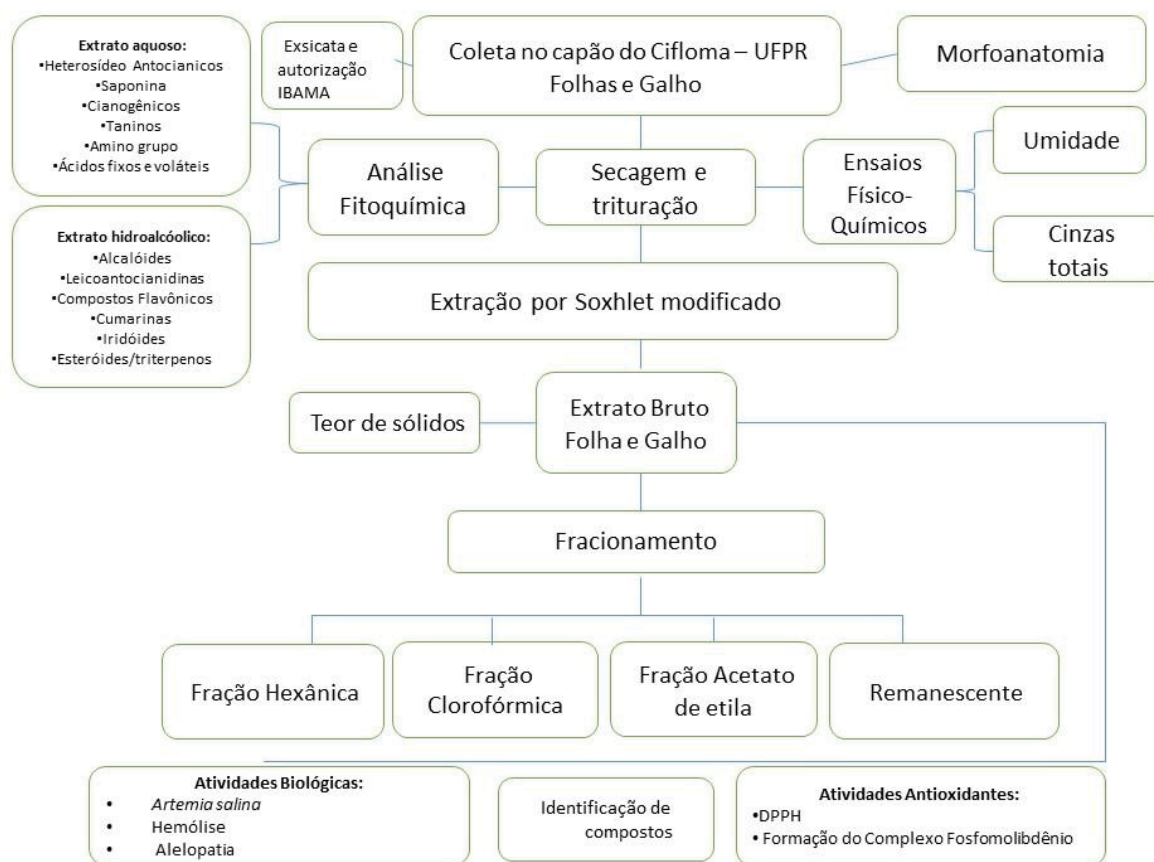
FIGURA 3 – REGISTRO DA EXSICATA DE *Myrsine parvula* (Mez) Otegui.



FONTE: O autor (2017)

O fluxograma esquemático apresentado na FIGURA 4 relata as etapas realizadas nesta pesquisa.

FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA



FONTE: O autor (2017)

3.2 ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

3.2.1 Umidade

A determinação da umidade do material vegetal seguiu a técnica de dessecação descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) em triplicata. Foram pesados 3 g da planta seca e moída, transferidos para um cadinho previamente dessecado e tarado. O material permaneceu em estufa com temperatura de 100 °C por 20 horas e após esse período foi resfriado em dessecador e pesado até obter peso constante. A porcentagem de água em relação à planta seca por fim foi determinada por meio da fórmula:

$$\% \text{ de água} = (P_u - P_s / P_a) \times 100$$

Pu = Peso do cadinho contendo amostra antes da dessecação

Ps = Peso do cadinho contendo amostra depois da dessecação

Pa = Peso da amostra

3.2.2 Cinzas totais

O método de determinação das cinzas totais da planta em estudo foi o relatado na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010), realizado em triplicata. Aproximadamente 3 g da planta seca foram transferidos para um cadinho previamente tarado, sendo acondicionado de maneira uniforme e incinerado com progressões na temperatura até no máximo (600± 25) °C, por 6 horas. Em seguida foi resfriado em dessecador e pesado. A porcentagem de cinzas foi calculada em relação à planta seca, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de cinzas} = (P2 - P1) / P3 \times 100$$

P1 = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento;

P2 = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador;

P3 = Peso da amostra inicial.

3.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

As análises fitoquímicas que foram realizadas serviram para identificar os principais grupos do metabolismo secundário da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui e foram realizados de acordo com Miguel (2003).

3.3.1 Extrato hidroalcoólico e fracionamento da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui

Para o preparo do extrato hidroalcoólico, 40 g da droga vegetal seca e moída (folhas e galho separadamente) foi submetida à maceração em 200 mL de álcool etílico 70% (m/m) em banho-maria a 70°C por 1 h. O material macerado foi filtrado em

papel de filtro e o volume completado para 200 mL com etanol 70% (m/m). Posteriormente o extrato foi concentrado até aproximadamente 30% do seu volume e fracionado com 20 ml de cada solvente por 10 vezes com polaridade em ordem crescente, em funil de separação obtendo-se a fração hexano (FH), clorofórmio (FC) e acetato de etila (FAE). Para cada fração obtida o volume foi completado para 200 mL com o próprio solvente. O resíduo do extrato constituiu a fração hidroalcoólica (FEOH), tendo seu volume completado para 200 mL com etanol 70% (m/m). As frações foram acondicionadas em frasco de vidro, rotuladas e mantidas sob refrigeração.

As pesquisas a seguir foram realizadas com os extratos e frações da folha e do galho.

3.3.1.1 Pesquisa de alcaloides

Para a pesquisa qualitativa dos alcaloides foram utilizados os reativos gerais de alcaloides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff) e iodo-iodeto de potássio (Reativo de Bouchardat).

Primeiramente 50 mL de cada fração do extrato hidroalcoólico foi levado à secura, evaporado em banho-maria a 70°C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e acrescentado 20 mL de HCl 1% (m/v). Para cada amostra testada foram feitos 3 tubos de ensaio com 2 mL do respectivo extrato clorídrico e 1 tubo somente com o extrato, servindo como controle negativo. Para cada tubo adicionaram-se duas a três gotas de um reativo. Considera-se positiva a presença de alcaloides na amostra com os seguintes precipitados:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada

3.3.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foram transferidos 10 mL de cada uma das frações FH, FC, FAE e FEOH em cápsula de porcelana e levadas ao banho-maria até a secura com exceção da fração FEOH que não necessitou ser concentrada. O resíduo foi dissolvido com 5 mL de

álcool etílico. Em seguida foi acrescido 5 gotas de HCl concentrado, levando ao aquecimento até ebulição. O surgimento de coloração vermelha indica que a reação é positiva.

3.3.1.3 Pesquisa de heterosídeos flavônicos

As frações: FH, FC, FAE (20 mL) foram levadas a secura em cápsula de porcelana e posteriormente dissolvidas em 10 mL de etanol. Cada fração teve 5 mL transferidos para respectivos tubos de ensaio, sendo que FEOH foi transferida diretamente ao tubo de ensaio, sem passar pela secura. Em cada tubo foram adicionados 1 cm de fita de magnésio e HCl concentrado lentamente. O resultado positivo é observado com o desenvolvimento de coloração rosada.

3.3.1.4 Pesquisa de flavonóis

Neste ensaio foi utilizado o teste Oxálico Bórico ou reação de Taubock, onde 10 mL de cada fração foram levados à secura e sobre elas foram adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), retornando a secura. Posteriormente foram adicionados 5 mL de éter etílico ao resíduo formado. A visualização foi realizada em ultravioleta e a presença de fluorescência indica reação positiva.

3.3.1.5 Pesquisa de cumarinas

Das frações, 30 mL foram concentrados em banho-maria (50°C) até 5 mL. A fração hidroalcoólica foi levada até pH 1 por adição de HCl 2 mols/L e 5 mL de HCl concentrado. Esta mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2 vezes de 10 mL). Essa fração etérea foi reunida e concentrada em banho-maria até 5 mL. Das frações concentradas foi transferido 3 mL para tubos de ensaio, onde foi adicionado 2 mL de NaOH (recém-preparado). Os tubos foram levados para a câmara de luz ultravioleta em 366 nm por 15 min. Na reação positiva é observada fluorescência azul ou verde amarelada.

3.3.1.6 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Em balões de fundo chato foram transferidos 30 mL das frações e 5 mL de solução aquosa de H₂SO₄ a 10% (m/v). A mistura permaneceu em refluxo por 30 minutos, e logo após foi filtrada, adicionando-se 30 mL de água destilada. Foi transferida para

um funil de separação, para extração com éter (2 vezes de 10 mL). Os extratos etéreos foram reunidos e concentrados em banho-maria, até um volume de 5 mL, e colocados em um tubo de ensaio, sendo adicionado 5 mL de NH_4OH (Reação de Borntraeger) e agitado lentamente. A reação é considerada positiva com observação de coloração vermelha.

3.3.1.7 Pesquisa de esteroides e triterpenos

As frações (30 mL) foram evaporadas até secura em banho-maria, logo após os resíduos redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados. De cada uma das amostras 0,1; 0,5 e 1,0 mL foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2 mL com clorofórmio.

a) Reação de Liberman-Bouchard: Nos tubos de ensaio foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 2 mL de H_2SO_4 concentrado lentamente. A formação da coloração rósea escura indica positivo para a função carbonila e/ou azul indica reação positiva para a função carbonílica na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6. A coloração verde indica função hidroxila e dupla ligação entre 5 e 6. Coloração amarela indica grupamento metila no carbono 14.

b) Reação de Keller Kelliani: Foram levados à secura 2 mL das frações. Os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1% (m/v). As misturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de H_2SO_4 concentrado. O surgimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo azul para esteroides e verde para triterpenos.

3.3.1.8 Pesquisa de iridoides

Em tubos de ensaio foram transferidos 2 mL de cada fração juntamente com uma pequena quantidade de cristais de floroglucinol e 1 mL de HCl concentrado. A coloração verde escura indica reação positiva.

O teste com duas gotas de H_2SO_4 concentrado adicionados à 2 mL de cada fração também foi realizado. O surgimento de coloração rosa violáceo apresenta reação positiva.

Foi adicionado 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina 1% (m/v) e duas gotas de H₂SO₄ concentrado em 2 mL das frações para pesquisar a presença de Iridoides, sendo a reação positiva com o desenvolvimento de uma coloração rosa cereja.

3.3.2 Preparo do extrato aquoso da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui

O extrato aquoso do galho foi preparado com 40 g do vegetal seco e moído e 200 mL de água destilada, sendo o da folha com 20 g e 100 mL de água destilada, ambos foram levados ao banho-maria a 70°C por 1 h. Em seguida o extrato foi filtrado e completado o volume com água destilada até 200 mL (galho) e 100 mL (folha) lavando o material com o líquido extrator.

As pesquisas a seguir foram realizadas no extrato aquoso da folha e do galho da planta em estudo.

3.3.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separados 5 mL do extrato aquoso do galho e da folha em 3 tubos de ensaio. No primeiro tubo de ensaio foi adicionado HCl 1% (m/v) até pH 4, o qual foi determinado com o auxílio de uma fita indicadora de pH. A reação é considerada positiva com o aparecimento de tons avermelhados.

O segundo tubo foi alcalinizado com NaOH até pH 10, observando-se tons azulados em caso de reação positiva.

O terceiro foi neutralizado a pH 7 com NaOH e para ser positivo teria o aparecimento de tons violáceos.

3.3.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Neste ensaio foram utilizados os 3 tubos de ensaio do teste anterior, sendo agitados energicamente por 5 minutos, medindo em seguida o anel de espuma formado. Logo após o repouso de 30 minutos, a presença de saponinas é indicada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

3.3.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Foram adicionados 5 mL do extrato aquoso (galho e folha) a um tubo de ensaio de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1 mL de H₂SO₄ 10% (m/v) ou 1 mol/L.

Ficou suspensa uma tira de papel picro sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria (60°C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro sódico. Para preparar o papel picro sódico, tiras de papel de filtro com 1cm de largura são embebidas em solução de ácido pícrico 1% (m/v) e secas ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são então embebidas em solução de carbonato de sódio 10% (m/v), secas e armazenadas em frasco âmbar.

3.3.2.4 Pesquisa de taninos

Foram transferidos 30 mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato de 100 mL e nele foram acrescentados 6 mL de formaldeído a 40% (m/v) e 4 mL de HCl 37% (m/v). A mistura foi levada para o refluxo por 1 h acoplada a um condensador de bolas. Após seu resfriamento, a solução foi filtrada e o material retido lavado com álcool 50% (m/m). Ao material retido no filtro foi acrescentado gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5% (m/v). A formação de coloração verde indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e 4 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1% (m/v). O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

3.3.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Esse teste seguiu os procedimentos para heterosídeos cianogênicos, porém com papel de tornasol substituindo o papel picro sódico. A presença de ácidos voláteis é indicada pela coloração avermelhada da fita para valores abaixo de pH 7.

3.3.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Em um balão foram adicionados 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1mol/L, que permaneceram em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, foram acidificados com H₂SO₄ 2 mols/L e extraído com éter etílico (3 vezes de 10 mL). Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50°C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa (100°C) por 10 minutos, resfriado e adicionados 5 mL de NH₄OH 1 mol/L. Em uma tira de papel de filtro foram concentradas três aplicações (3 gotas em cada aplicação), a primeira com o resíduo amoniacal, a segunda o resíduo amoniacal mais uma

gota do reativo de Nessler e a terceira somente o reativo de Nessler. A coloração na aplicação 2 diferente da 1 e 3 indica a presença de ácidos fixos.

3.3.2.7 Pesquisa de amino grupo

Para essa pesquisa 10 mL do extrato aquoso foram concentrados em banho-maria a 60°C até 5 mL. Com o auxílio de um bastão de vidro foram feitas duas aplicações separadamente (aproximadamente 5 gotas do extrato concentrado) em papel de filtro. Em uma das aplicações foi gotejado o reativo de Ninhidrina, e a outra permaneceu como referência. O papel de filtro foi levado à estufa à temperatura de 100°C durante 15 minutos. A formação de coloração azul violácea indica reação positiva.

3.4 EXTRATOS E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA

3.4.1 Obtenção do Extrato Bruto

As partes aéreas secas e moídas da planta *Myrsine parvula* (Mez) Otegui foram extraídas separadamente em aparelho de Soxhlet modificado por Carvalho (2001), patenteado sob número do registro: PI 0601703-7 A. Ao aparelho foi conectado um condensador, permitindo que o solvente seja continuamente reutilizado no processo. No suporte de vidro do aparelho um volume adequado do material vegetal foi introduzido, sendo 538 g para as folhas e 1414 g para o galho (neste suporte há uma placa porosa e uma camada de algodão para conter o material vegetal), sobre este material foi adicionado cerca de 3500 mL de álcool 93,2 °GL para extração. Com o sistema sob aquecimento em manta aquecedora, o álcool presente no balão foi evaporado e posteriormente condensado no condensador de bolas. Deste modo, o líquido extrator percorreu novamente o material vegetal, permitindo a extração. Todo o sistema foi deixado em refluxo por 15 horas para a folha (divididos em 2 dias, sendo 6h no dia 1 e 9h no dia 2) e 28 horas para o galho (permanecendo 9h por dia, em 3 dias).

3.4.1.1 Determinação do teor de sólidos do extrato bruto

A determinação do teor de sólidos seguiu a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

Em três placas de Petri previamente dessecadas foram adicionados 10 mL do extrato bruto da folha e galho separadamente com o auxílio de uma pipeta volumétrica. As placas foram mantidas em estufa à 105°C até a obtenção de peso constante. O

resultado foi determinado pela porcentagem em peso do teor de sólidos em relação à amostra vegetal.

3.4.2 Fracionamento do extrato bruto

As frações foram obtidas pelo sistema de partição líquido-líquido, onde solventes de ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila) foram utilizados. Para o sistema de partição líquido-líquido foi utilizado o aparelho Soxhlet modificado por Carvalho (2001) conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo esse sistema foi submetido ao aquecimento em manta aquecedora e mantido sob refluxo por 6 horas.

Após o término do processo, o solvente de cada fração foi removido por destilação e a fração levada ao banho-maria até a secura (40-50°C). O cálculo do rendimento de cada fração foi baseado na quantidade obtida dos extratos brutos da folha e galho, sendo considerados como 100%.

3.4.3 Caracterização dos Compostos

Para a tentativa de isolamento das substâncias presentes nas frações hexano e clorofórmio da folha, foi realizado cromatografia em coluna aberta (3,0 x 50 cm) empacotada com fase estacionária Sílica gel 60 com o eluente hexano: acetato de etila (100:95).

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) utilizando o aparelho RMN Bruker® DPX 200 MHz (operando a 4,7 Tesla) foram realizados para identificação dos compostos isolados da fração hexano folha, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente. Para o preparo das amostras foi utilizado como solvente o clorofórmio deuterado e duas gotas de TMS (tetrametilsilano). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao sinal do TMS em 0 ppm. A identificação baseia-se na comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os dados da literatura. Esta análise foi realizada no departamento de Química da UFPR.

Para avaliação do perfil cromatográfico, amostras do extrato bruto (20 mg/mL) e fração acetato de etila (10 mg/mL) da folha e galho da *Myrsine parvula* foram analisados por CLAE/DAD (Merck Hitachi® Elite Lachrom), diluídos em metanol grau HPLC.

A detecção das amostras foi por meio da varredura de espectro de 200 a 400 nm, com tempo de corrida de 45 minutos. A coluna analítica utilizada foi a XTerra® RP18 (4,6 mm x 250 mm, partículas 5 µm) a 25°C com volume de injeção de 20 µL e fluxo 1,00 mL/minuto.

Conforme descrito no QUADRO 2, a eluição foi realizada em gradiente de concentração, sendo a fase A ácida (ácido fosfórico PA: ácido sulfúrico 0,1 mol/L: água miliQ, na proporção 2: 200: 800 MI) e a fase B metanol.

QUADRO 2 – GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO EMPREGADO NAS ANÁLISES DE CLAE/DAD

TEMPO (minutos)	FASE A: FASE ÁCIDA	FASE B: METANOL	FLUXO DE INJEÇÃO
0,0	80%	20%	1,0 mL/minuto
3,0	80%	20%	1,0 mL/minuto
35,0	0	100%	1,0 mL/minuto
40,0	0	100%	1,0 mL/minuto
43,0	80%	20%	1,0 mL/minuto

FONTE: O autor (2017).

Para identificação dos compostos presentes na fração acetato de etila da folha foram realizados espectros de RMN, utilizando o aparelho Bruker® AVANCE 400 MHz (operando em 9,4 Tesla), observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 400,13 e 100,61 MHz. A amostra foi preparada utilizando o DMSO (dimetilsulfóxido) deuterado como solvente. Esta análise ocorreu no departamento de Bioquímica da UFPR.

3.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A análise morfológica foi realizada nas folhas da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui com auxílio de uma régua, medindo o comprimento e largura e observando as características por meio de lupa. Primeiramente a planta foi fixada em solução FAA 70% (5 mL de formaldeído, 5 mL de ácido acético glacial e 90 mL de álcool a 70% (m/m)) por uma semana (JOHANSEN, 1940). Em seguida foi estocada em álcool 70% (m/m). (BERLYN; MIKSCH, 1976).

3.5.1 Preparo da lâmina

3.5.1.1 Diafanização ou clareamento

A planta foi seccionada e depositada em vidro de relógio com água. Na sequência foi clarificado em placa de petri com solução de hipoclorito de sódio 10% (v/v) por 24 horas. Após esse período, a amostra vegetal foi lavada com água destilada por 6 vezes de 15 em 15 minutos. Posteriormente o material foi lavado em uma solução de ácido acético a 5% para neutralizar o pH, seguido com a lavagem em água destilada e corado com safranina 1%. A lâmina foi montada com glicerina a 50%. (FUCHS, 1963).

3.5.1.2 Lâminas semipermanentes

As lâminas semipermanentes foram obtidas por meio de secções transversais e longitudinais e ainda por cortes paradérmicos feitas à mão livre. (OLIVEIRA E AKISUE, 1997). Os cortes realizados foram corados com azul de astra e fucsina básica e azul de toluidina. (O'BRIEN, FEDER, McCULLY, 1964). Seguindo BERLYN e MIKSCHE (1976) as lâminas foram montadas com glicerina a 50%. A lútagem foi feita com esmalte incolor. (BEÇAK, PAULETTE, 1976).

3.5.2 Teste histoquímico

Para esse ensaio foram realizadas secções transversais do material fixado, à mão livre e utilizados reativos conforme indicado no QUADRO 3.

QUADRO 3 – ENSAIOS HISTOQUÍMICOS REALIZADOS NA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*

Reativo	Evidencia	Referência
Cloreto férrico	Compostos fenólicos	JOHANSEN (1940)
Sudam III	Lipídeos	SASS (1951)
Floroglucina clorídrica	Lignina	FOSTER (1949)
Lugol	Amido	BERLYN; MIKSCHE (1976)
Ácido sulfúrico	Natureza dos cristais	OLIVEIRA; AKISSUE (1997)

FONTE: O autor (2017)

Os resultados dos testes com esses reativos foram registrados por meio de fotomicrografias em microscópio óptico acoplado à câmera digital.

3.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em alto vácuo. (SOUZA, 2007). Para esse ensaio as amostras foram fixadas em FAA 70%, desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico. Em seguida foi realizada a metalização da amostra.

3.6 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

Para a avaliação da possível atividade antioxidante do extrato bruto da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui e suas frações foram utilizados os seguintes métodos: a formação do complexo fosfomolibdênio, técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) e a avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), através da técnica de Mensor et al. (2001).

3.6.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

Nesse ensaio soluções metanólicas dos extratos e frações da folha e galho foram preparadas com concentração final de 200 µg/mL, destas foram adicionados 0,3 mL em tubos de ensaio juntamente com 3 mL de solução do reagente do complexo fosfomolibdênio (ácido sulfúrico 0,6 mol/L, fosfato de sódio 28 mmol/L, molibdato de amônio 4 mmol/L). Os tubos contendo essas soluções foram fechados e mantidos em banho-maria (95 °C) por 90 minutos. Após o resfriamento foi realizada a leitura a 695 nm em espectrofotômetro UV- 1601 Shimadzu®, utilizando como branco uma solução de 0,3 mL de metanol com 3,0 mL do reagente.

A ação antioxidante da amostra foi expressa em relação à rutina (200 µg/mL) usada como padrão, e vitamina C (200µg/mL) cuja atividade antioxidante de referência é considerada 1,00. O resultado foi expresso em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e a rutina por meio das fórmulas:

$$\text{AAR\% em RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)} \times 100}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}}$$

$$\text{AAR\% em RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)} \times 100}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}}$$

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey no SISVAR. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3.6.2 Ensaio antioxidante por redução do radical DPPH

A solução de DPPH utilizada no teste foi na concentração de 0,03 mmol/mL em etanol absoluto. No início do ensaio foram feitas diluições da solução mãe de cada amostra (1mg/mL) que variam de 5 a 200 µg/mL sendo screening para construção da curva IC₅₀. Na microplaca de 96 poços foi onde ocorreram as reações, e onde as diluições foram preparadas conforme o QUADRO 4.

QUADRO 4 – PREPARO DAS AMOSTRAS NO ENSAIO DPPH

Amostra	Teste
Branco	142 µL amostra + 58 µL metanol
Amostra (BF, HF, AEF, CF, RF, BG, HG, AEG, CG, RG)	142 µL amostra + 58 µL DPPH
Padrão (RUTINA E VITAMINA C)	142 µL padrão + 58 µL DPPH 142 µL padrão + 58 µL metanol (Branco)
Controle negativo	142 µL metanol + 58 µL DPPH

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG).

Essas amostras ficaram em repouso por 30 minutos em local escuro com temperatura ambiente.

Os padrões utilizados foram a vitamina C e a rutina. Após o período de repouso, a leitura foi realizada em 518 nm em espectrofotômetro. As etapas foram feitas em

triplicata. A porcentagem da atividade antioxidante (AA) foi medida por meio da fórmula:

$$AA\% = \frac{100 - (\text{Abs da amostra} - \text{Abs do branco}) \times 100}{\text{Abs do controle positivo}}$$

Por meio de um gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra da fração e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração, o valor da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC₅₀) foi determinado. Os resultados foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Tukey (p<0,05) no SISVAR.

3.7 TOXICIDADE *in vitro*

3.7.1 Toxicidade frente à *Artemia salina*

Seguindo Meyer et al. (1982) para a realização do teste, os ovos de *Artemia salina* foram estimulados a eclodir e assim obter os náuplios. Primeiramente foi preparada a solução salina, pesando 38 g de sal marinho (Blue Greasure – Reef Sea Salt) e solubilizando em 1000 mL de água destilada em balão volumétrico, ajustando o pH entre 8 – 10 com carbonato de sódio. Os ovos foram adicionados à solução salina (200 mg de ovos/400 mL de solução salina) e permaneceram sob aeração e agitação contínua, expostos à iluminação de 20W e temperatura ambiente por 48 horas.

As amostras dos extratos brutos e frações da planta foram preparadas com concentração inicial de 10 mg/mL em metanol. Alíquotas de 2,5, 25, 75, 125 e 250 µL dessas amostras, foram transferidas para frascos adequados e levados à estufa (40°C) por 24 horas antes do teste, onde houve evaporação total do solvente. O controle positivo utilizado foi o sulfato de quinidina preparado da mesma maneira que as amostras dos extratos brutos e frações. O controle negativo (metanol) foi avaliado somente na concentração de 1000 µg/mL.

Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios foram separados e transferidos para cada frasco contendo as amostras e controles, ajustando o volume para 2,5 mL com a solução salina, obtendo as concentrações finais de 10 µg/mL, 100 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL para cada amostra. Esses frascos foram mantidos no escuro por 24 horas e na sequência se realizou a contagem dos indivíduos mortos com auxílio de lupa e iluminação adequada. O teste foi feito em triplicata.

Os resultados desse teste foram analisados por meio do método estatístico Probitos, no programa SPSS, onde os valores de CL_{50} foram determinados. Valor menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$ é indicativo de toxicidade.

3.7.2 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi baseada no teste descrito por Aslam et al (2011), onde amostras dos extratos brutos e frações da *Myrsine parvula* foram preparadas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (dissolvidas em 1 mL de metanol e em 9 mL da solução PBS). A partir dessa solução mãe (1000 $\mu\text{g/mL}$), diluições foram feitas para avaliar as amostras nas concentrações de 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

A solução PBS (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de KH_2PO_4 e água destilada q.s.p. 1000 mL) foi preparada em balão volumétrico de 1000 mL e armazenada em geladeira. Durante seu uso no experimento foi mantida resfriada.

Paralelamente o sangue utilizado no ensaio foi preparado, centrifugando 3 mL de sangue de carneiro desfibrilado (Newprov) a 3000 rpm por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi desprezado. Ao sangue centrifugado foi adicionado 5 mL de PBS gelado e levado a centrifugação novamente, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes até o sobrenadante ficar incolor. Ao final o volume da papa de hemácia foi diluída a 2,5% com a solução PBS.

Como controles positivos foram utilizados a solução Triton 0,1% (m/v) em água destilada e solução de saponina nas mesmas concentrações das amostras. Para o controle negativo foram usados metanol, a solução PBS e solução de rutina.

Logo após o preparo das amostras e controles, o teste foi realizado em eppendorfs de 1,5 mL conforme o QUADRO 5.

QUADRO 5 – PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO HEMOLÍTICO

Amostra	Teste
Amostras dos extratos e frações nas concentrações de 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.	20 µL de solução da amostra + 180 µL de hemácia
Controle positivo Triton 0,1%	20 µL de Triton 0,1% + 180 µL de hemácia
Controle positivo saponina nas concentrações de 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.	20 µL de solução saponina + 180 µL de hemácia
Controle negativo Metanol	20 µL de metanol + 180 µL de hemácia
Controle negativo PBS	20 µL de PBS + 180 µL de hemácia
Controle negativo rutina nas concentrações de 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.	20 µL de solução rutina + 180 µL de hemácia

FONTE: O autor (2017).

Essas soluções foram mantidas em estufa (37°C) por 30 minutos com as tampas dos eppendorfs abertas. Na sequência foram adicionadas ao banho de gelo por 5 minutos para encerrar o processo hemolítico. Após esse procedimento as soluções foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos.

Posteriormente 100 µL do sobrenadante foram retirados das amostras e controles e diluídos em 900 µL de PBS gelado, desta diluição 200 µL foram transferidos para a microplaca de 96 poços. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata. A leitura foi realizada em 570 nm no espectrofotômetro UV- 1601 Shimadzu®.

O cálculo da porcentagem de hemólise se dá por meio da fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = (\text{Abs}_A / \text{Abs}_T) * 100$$

onde:

AbsA= absorbância da amostra

AbsT= absorbância do Triton (controle positivo)

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Foi avaliada a ação alelopática do extrato bruto e frações da *Myrsine parvula* sobre as sementes de *Lactuca sativa* (alface – baba de verão).

Primeiramente as caixas Gerbox (caixas de poliestireno de cristal quadradas com tampas, tamanho de 11 cm e 3,5 cm de altura) foram devidamente higienizadas com água e sabão, hipoclorito de sódio 1% e álcool 70% (m/m). Os papéis de filtro (Whatman nº. 6) foram autoclavados e todos os utensílios utilizados no processo foram higienizados com álcool 70% (m/m).

Dois papéis de filtro foram colocados em cada gerbox e 6 mL das soluções das amostras foram adicionadas nas seguintes concentrações: 500 µg/ mL, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. Para cada amostra foram preparadas duas caixas, uma destinada ao ensaio de germinação e outra para a avaliação do crescimento. Após a adição da amostra, as caixas permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas para evaporação do solvente. Na sequência 20 sementes da espécie em teste foram depositadas em cada Gerbox, juntamente com 6 mL de água destilada. Para o grupo controle o mesmo procedimento foi realizado, somente substituindo a amostra por água destilada ou metanol. Logo após foram levadas à câmara de germinação (BOD) em condições de temperatura (25°C), umidade relativa (\pm 80%) e luz controlada (160 W) conforme a espécie da semente. (DIAS et al, 2005).

O extrato bruto e a fração hexano da folha e galho foram avaliados em dias diferentes das demais frações, utilizando, portanto, diferentes controles água e metanol.

3.8.1 Teste de germinação

Com base na metodologia de Macias et al. (2000) foi realizada a contagem e retirada diária do número de sementes germinadas tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2 mm de comprimento. Esse procedimento foi realizado por 7 dias em fluxo laminar. A germinação foi avaliada por meio do Índice de Velocidade de Germinação (MAGUIRE, 1962) sendo calculado por meio da quantidade de sementes germinadas divididas pelo dia da germinação e somadas até o último dia da germinação. As médias do IVG foram submetidas à análise estatística.

A porcentagem de germinação também foi calculada, considerado 20 sementes germinadas como 100% e a quantidade de cada amostra que germinou gerou uma porcentagem. Os resultados foram comparados estatisticamente apenas com o padrão água.

3.8.2 Teste do crescimento

O teste do crescimento seguiu a metodologia descrita por Barnes et al., (1987) e Macias et al., (2000). No sétimo dia do teste, o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleóptilo foi medido com o auxílio de paquímetro digital. As medidas foram submetidas à análise estatística.

3.8.3 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-knott auxiliado pelo programa SISVAR. (FERREIRA, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS FÍSICO QUÍMICOS

4.1.1 Umidade

Os teores de umidade da planta encontrados estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 – TEOR DE UMIDADE OBTIDOS NAS FOLHAS E GALHO DA *Myrsine parvula*

<i>Myrsine parvula</i>	Média (%) \pm Desvio padrão
Folhas	9,70 \pm 0,28
Galho	11,41 \pm 0,18

FONTE: O autor (2016)

Esses valores estão dentro do teor máximo de umidade estabelecido pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, onde há variações de 8 a 14% na maioria das monografias. (BRASIL, 2010). Esse parâmetro pode ser usado para ensaios de controle de qualidade da planta, além de fornecer dados que auxiliem na conservação da amostra, devido à quantidade de água presente na mesma ser conhecida, pois é por meio da água que ações enzimáticas ocorrem e propiciam o desenvolvimento de bactérias e fungos. Neste caso, como os valores apresentados estão dentro dos parâmetros, as atividades dessas enzimas são reduzidas. (FARIAS, 2003).

4.1.2 Cinzas totais

O teor de cinzas presente na folha e galho da planta em estudo estão apresentados na TABELA 4.

TABELA 4 - TEOR DE CINZAS TOTAIS OBSERVADO NAS FOLHAS E GALHO DA *Myrsine parvula*

<i>Myrsine parvula</i>	Média (%) \pm Desvio padrão
Folhas	8,59 \pm 0,01
Galho	4,37 \pm 0,19

FONTE: O autor (2017)

O teor de cinzas totais é realizado em procedimentos de controle de qualidade da planta, analisando se a mesma apresenta impurezas. Embora não haja na Farmacopeia Brasileira 5ª edição o teor específico para a espécie em estudo, a

maioria das monografias trazem valores com limites máximos de até 14%. Por comparação os resultados obtidos se encontram dentro deste limite.

4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.2.1 Extrato hidroalcoólico e frações da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui

Os resultados obtidos nos ensaios avaliados se encontram na TABELA 5.

TABELA 5 – RESULTADOS DA ANÁLISE FITOQUÍMICA NO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*

Ensaio	FHF	FCF	FAEF	FOHF	FHG	FCG	FAEG	FOHG
Alcaloides								
• Reativo de Mayer	-	-	-	-	-	-	-	-
• Reativo de Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-
• Reativo de Bouchardat	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	+	+	-	+	+	+
Heterosídeos Flavônicos	-	-	+	+	-	-	+	+
Flavonóides pelo teste oxálico-bórico	-	-	+	+	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Iridoides								
• Reação com Floroglucinol	+	-	-	-	-	-	-	-
• Reação com ácido sulfúrico R	-	-	-	-	-	-	-	-
• Reação com valinila	-	-	-	-	-	-	+	+
Heterosídeo Antraquinônico	+	-	-	-	-	-	-	-
Esteróides/Triterpenos								
• Reação de Liberman-Bouchard	verde	amarelo	amarelo	amarelo	amarelo	amarelo	-	-
• Reação de Keller Kelliani	-	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: O autor (2016)

LEGENDA: (+) positivo, (-) negativo. FHF= Fração Hexano Folha, FCF= Fração Clorofórmio Folha, FAEF= Fração Acetato de Etila Folha, FOHF= Fração Hidroalcoólica Folha, FHG= Fração Hexano Galho, FCG= Fração Clorofórmio Galho, FAEG= Fração Acetato de Etila Galho, FOHG= Fração Hidroalcoólica Galho.

Não houve precipitados formados nas reações da pesquisa de alcaloides, gerando resultado negativo nas frações das folhas e galho. Também não há presença de cumarinas segundo o teste realizado, onde não foi observada fluorescência azul ou verde amarelado em nenhuma das frações da planta.

O surgimento de coloração vermelha nas frações acetato de etila da folha e galho, na fração clorofórmio do galho, assim como nas frações hidroalcoólica de ambas as partes da folha indica a presença de leucoantocianidinas, que são flavonóides monoméricos. (DIAS, J.F.G., 2005; ROCHA, W.S. et al., 2011).

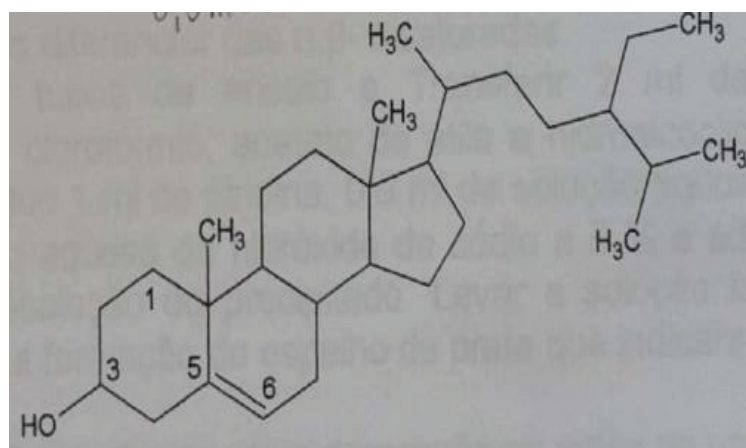
A presença de outros flavonoides em especial as flavonas foram vistas nas frações acetato de etila e hidroalcoólica da folha e do galho pelo surgimento da coloração amarelo rosado. Já no teste de oxálico-bórico a fluorescência amarela esverdeada foi observada nas frações acetato de etila e hidroalcoólica da folha somente, indicando flavonóis.

Na pesquisa de iridoides a fração hexano da folha apresentou coloração verde escura na reação com cristais de floroglucinol indicando positividade. Já na reação com valinila somente as frações acetato de etila e hidroalcoólica mostraram coloração rosa cereja. O teste com ácido sulfúrico não apresentou resultado positivo para nenhuma fração.

Somente a fração hexano da folha apresentou positividade para heterosídeo antraquinônico com coloração vermelha.

Na reação de Liberman-Bouchard para pesquisa de esteroides e triterpenos a FHF ficou verde indicando uma possível presença da função hidroxila e dupla ligação entre 5 e 6. As frações FCF, FAEF, FOHF, FHG, FCG por meio da coloração amarela indicaram a presença de grupo metila no carbono 14. Somente as frações FAEG e FOHG não alteraram a coloração (FIGURA 5). No ensaio de Keller Kelliani em nenhuma fração foi observada coloração verde ou azul.

FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ESTERÓIDES E/OU TRITERPENOS



FONTE: MIGUEL (2003).

4.2.2 Extrato aquoso da *Myrsine parvula* (Mez) Otegui

Os resultados mostrados na TABELA 6 referem-se aos apresentados pela folha e galho da planta em estudo no extrato aquoso.

TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS FITOQUÍMICOS DO EXTRATO AQUOSO DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*

Ensaio	Folha	Galho
Heterosídeo Antociânico		
• Meio ácido	-	-
• Meio alcalino	-	-
• Meio neutro	-	-
Heterosídeos Saponinicos	-	-
Heterosídeo Cianogenético	-	-
Taninos		
• Taninos condensados	(+)	(+)
• Taninos hidrolizáveis	-	-
• Taninos por cloreto férrico	-	-
• Amino Grupo	(+)	(+)
• Ácidos voláteis	-	-
• Ácidos fixos	-	-

FONTE: O autor (2016)

LEGENDA: (+) positivo (-) negativo.

No ensaio de amino grupo houve o aparecimento da cor azul violáceo na mancha do extrato aquoso da folha e do galho depositada em papel de filtro com Ninhidrina, indicando reação positiva.

No ensaio com cloreto férrico a 1% realizado para detectar taninos não houve o desenvolvimento de cor azul indicando taninos. Em outro ensaio houve somente resultado positivo para presença de taninos condensados com desenvolvimento de cor verde no resíduo após adição de álcool 50% e gotas de KOH a 5% tanto na folha quanto no galho.

Para heterosídeos antociânicos não houve alteração de cor com as mudanças de pH indicando resultado negativo assim como no ensaio de heterosídeos saponinicos, onde a espuma formada não atingiu 1 cm de altura nem persistiu. No teste de cianogênicos o papel picro-sódico não apresentou coloração avermelhada.

Os ácidos fixos e voláteis também não geraram resultados positivos para o extrato aquoso da folha e galho da *Myrsine parvula*.

A análise fitoquímica realizada serviu para dar continuidade à pesquisa, direcionando o fracionamento e respectivos ensaios biológicos. Alguns dos resultados encontrados também estão presentes em plantas do mesmo gênero e família, principalmente flavonóides correlacionados com atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, os esteroides e triterpenos presentes nas atividades antimicrobianas e antitumorais, as antraquinonas com ação antimicrobiana e os taninos com a atividade alelopática. (LOPES et al, 2011; BURGER et al, 2015; KPCZURKILWICZ et al, 2013; SILVA, AQUILA, 2006; WANG et al, 2012).

4.3 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES

Após o processo de secagem da planta, assim como a separação do galho das folhas, seguido pela moagem das partes aéreas, o extrato etanólico foi realizado separadamente em aparelho de soxhlet, sendo 538 g para as folhas e 1414 g para o galho.

A quantidade e o rendimento obtido do extrato etanólico da folha e galho por meio do ensaio de teor de sólidos estão representados na TABELA 7. Posteriormente foram separados 5 g do extrato etanólico (folha e galho) para as atividades biológicas e o restante para o preparo das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente. O rendimento obtido das frações se encontram na TABELA 8.

TABELA 7 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*

Material vegetal seco (g)		Extrato etanólico (g)	Rendimento em relação ao material vegetal seco (%)
Folha	538,88	78,40	14,54
Galho	1414,6	54,00	03,82

FONTE: O autor (2016)

TABELA 8 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*

Fração	Rendimento %
Hexano Folha	34,62
Clorofórmio Folha	3,18
Acetato de etila Folha	0,74
Remanescente Folha	17,89
Hexano Galho	24,60
Clorofórmio Galho	4,28
Acetato de etila Galho	3,05
Remanescente Galho	31,82

FONTE: O autor (2016)

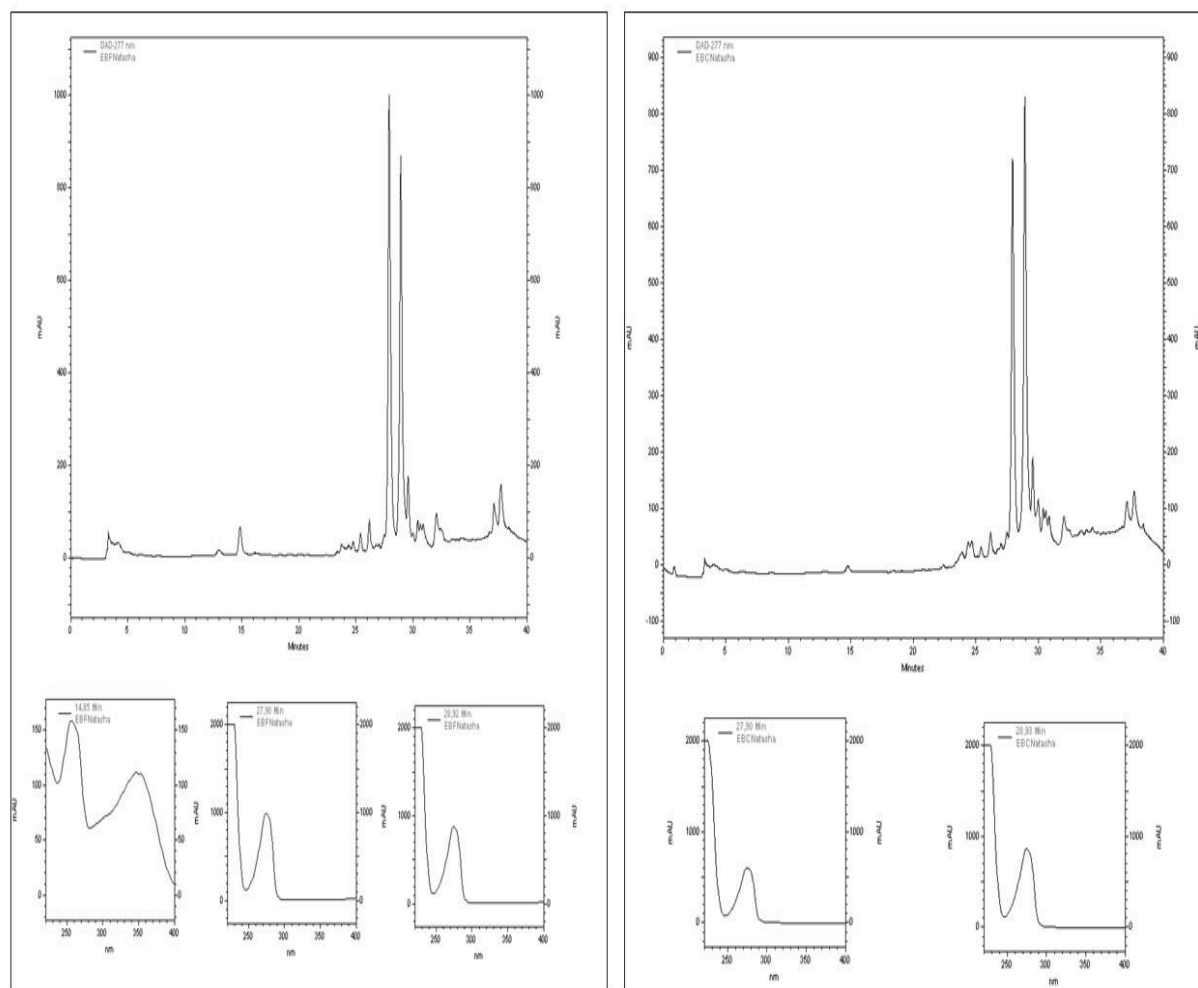
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Na coluna cromatográfica realizada com a fração hexano da folha foram recolhidos 199 frascos com aproximadamente 10 mL de eluente (hexano:acetato de etila) que foram levados a secar em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Os frascos de número 7 a 18 foram reunidos, da mesma maneira os frascos 19 a 24, obtendo dois isolados amarelos, posteriormente purificados com éter de petróleo frio. Os demais frascos que não apresentaram cristais foram solubilizados com clorofórmio, reunidos e armazenados. Estes isolados foram enviados para identificação por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN), porém não foi possível a identificação completa devido as condições da amostra, sabe-se apenas que se trata do mesmo ácido graxo nos dois isolados.

Na fração clorofórmio da folha foram obtidos 203 frascos com 10 mL aproximadamente de eluente (hexano:acetato de etila) mas não houve formação de cristais no processo de separação em coluna cromatográfica.

O extrato bruto da folha e galho submetidos à CLAE apresentaram um perfil cromatográfico semelhante em 277 nm, conforme ilustrado na FIGURA 6.

FIGURA 6 – CROMATOGRAMA OBTIDO DO EXTRATO BRUTO DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula* POR MEIO DA CLAE EM 277 nm

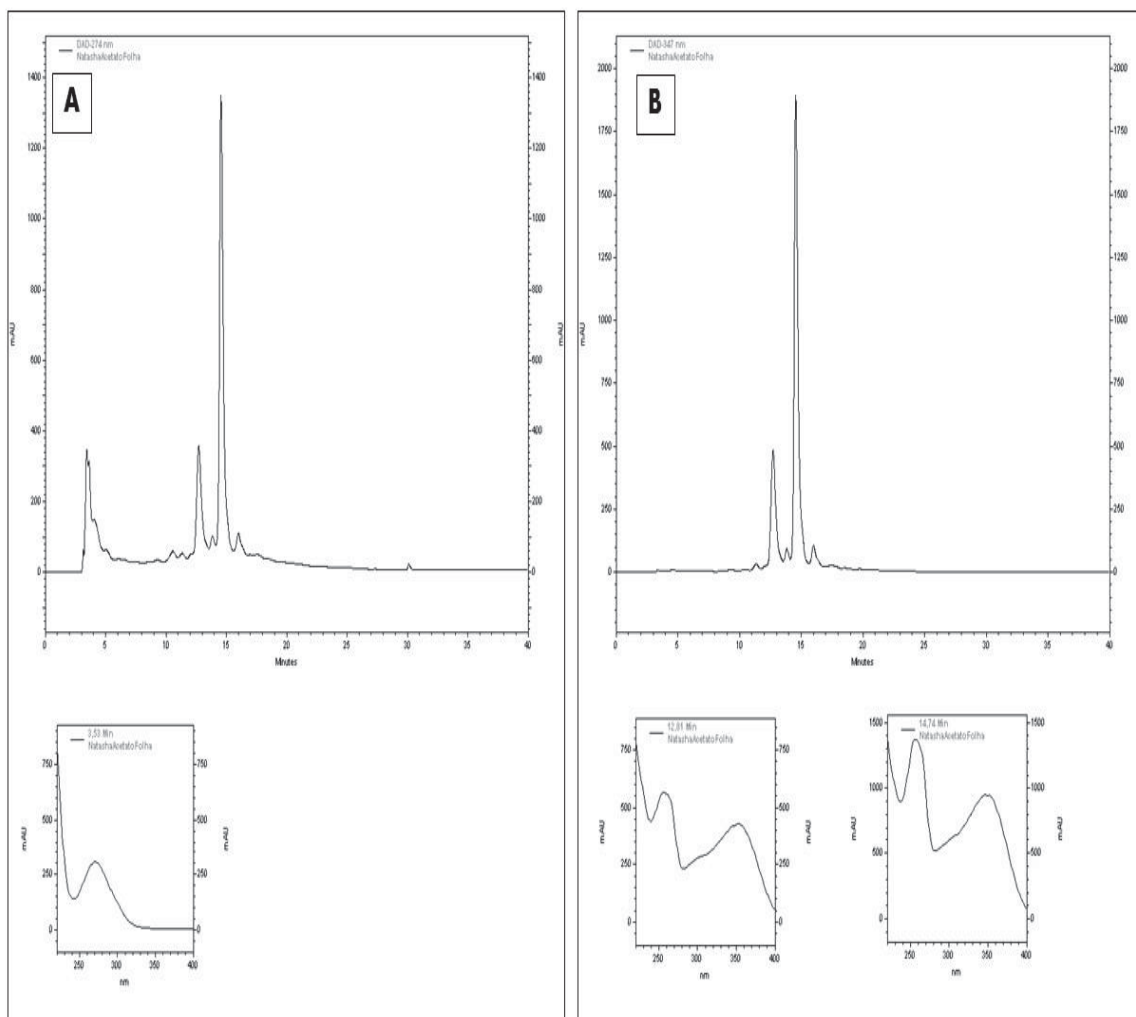


FONTE: O autor (2017).

Ambas amostras apresentaram picos com tempo de retenção de 27,90 e 28,90 minutos com absorção máxima em 277 nm, sugerindo a presença de um mesmo composto nos dois extratos brutos.

Na fração acetato de etila da folha foi possível detectar a presença dos compostos rutina e ácido gálico através da CLAE, comparando com os dados dos padrões dos mesmos no sistema utilizado. (FIGURA 7).

FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA FOLHA DA *Myrsine parvula* POR CLAE



FONTE: O autor (2017).

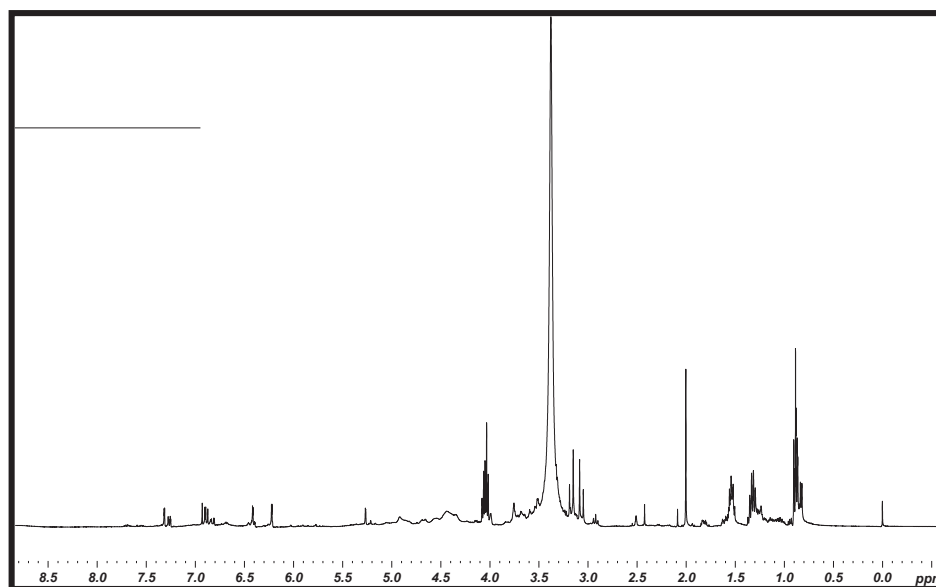
LEGENDA: A – perfil cromatográfico em 274 nm (ácido gálico), B – perfil cromatográfico em 347 nm (rutina).

Na FIGURA 7 A um pico foi detectado com tempo de retenção de 3,53 minutos em 274 nm indicando ser o ácido gálico. Já em 347 nm, dois picos com tempo de retenção em 12,81 e 14,74 podem ser observados na FIGURA 7 B, sugerindo ser a rutina.

A partir do resultado obtido, a amostra da fração acetato de etila da folha foi para análise em RMN para confirmar e caracterizar a presença destes compostos. O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 8) e do ^{13}C (FIGURA 9) da amostra confirma a

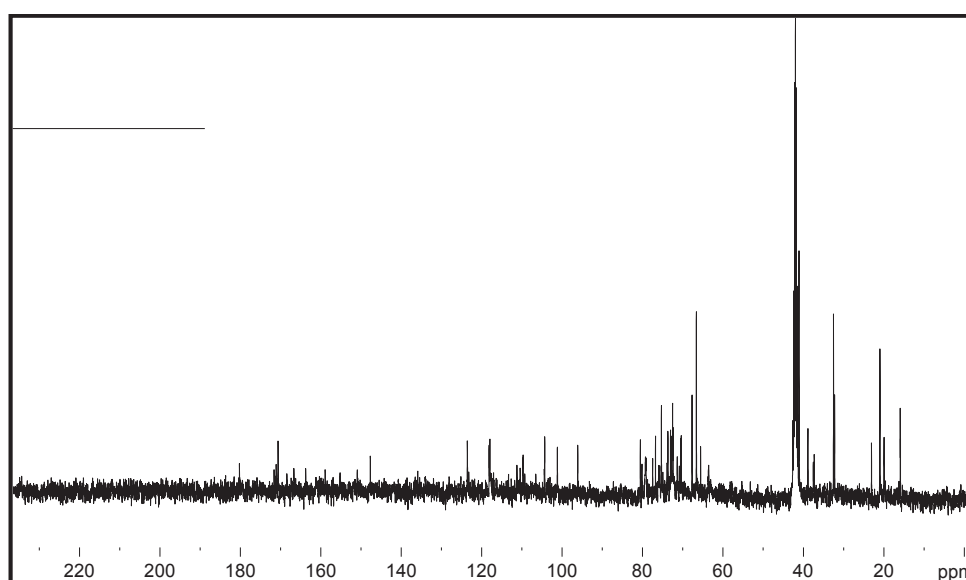
presença da rutina e do ácido gálico por comparação com os dados da literatura de RMN de ^1H e ^{13}C (TABELA 9 e 10).

FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA FOLHA DE *Myrsine parvula*



FONTE: O autor (2018)

FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA FOLHA DE *Myrsine parvula*



FONTE: O autor (2018)

TABELA 9 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA DA RUTINA

Posição	RMN de ^{13}C experimental	RMN de ^{13}C literatura*	RMN de ^1H experimental	RMN de ^1H literatura*
6	98,8	98,7	6,22 d (2,1)	6,20 d (2,1)
8	93,8	93,6	6,41 d (2,1)	6,40 d (2,1)
2'	115,7	116,2	7,31 d (2,2)	7,53 d (2,0)
5'	115,3	115,2	6,88 d (8,3)	6,83 d(9,0)
6'	121,3	121,0	7,26 dd (8,3; 2,2)	7,75 dd (7,8; 2,4)

FONTE: O autor (2018)

*MOURA, A.C.S. et al. (2011). Valores estão em ppm relativos ao sinal do TMS como padrão. Números em parêntese demonstram constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Sinais: d=dubleteo, dd=duplo dubleteo.

TABELA 10 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA LITERATURA DO ÁCIDO GÁLICO

Posição	RMN de ^{13}C experimental	RMN de ^{13}C literatura	RMN de ^1H experimental	RMN de ^1H literatura
2,6	108,9	108,8	6,92 s	6,92 s
3,5	147,7	145,4		
1'	170,6	170,4		

FONTE: O autor (2018)

*MOURA, A.C.S. et al. (2011). Valores estão em ppm relativos ao sinal do TMS como padrão. Números em parêntese demonstram constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Sinais: s=simpleto, d=dubleteo.

O espectro de RMN de ^1H da fração acetato de etila da folha da espécie *Myrsine parvula* apresenta sinais característicos do composto ácido gálico. É possível observar a presença de um simpleto em δ_{H} 6,92, indicando um anel aromático tetrasubstituído, este sinal corresponde a dois hidrogênios equivalentes presentes na posição 2 e 6 do anel aromático. Além disso, foram observados sinais característicos de rutina, dois dupletos na região de aromáticos, um em δ 6,22 (d; J = 2,1; H-6) e outro em δ 6,41 (d; J = 2,1; H-8), indicando a presença de um anel tetra substituído, com dois hidrogênios meta (anel A). Os sinais em δ 7,31 (d; J= 2,2; H-2'), δ 6,88 (d; J= 8,3; H-5') e δ 7,26 (dd; J = 8,3;2,2 H-6') corroboram o padrão 1,3,4-trissubstituído para o anel B, o valor dos deslocamentos dos três hidrogênios comprova a presença de OH na posição 3' e 4'.

No espectro de RMN ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ observa-se a presença do sinal em δ_c 170,6 referente ao carbono presente na posição 1', com deslocamento químico característico de carbonila. Também foram observados sinais em δ_c 108,9 ppm referente aos carbonos simétricos presentes na posição 2 e 6 e δ_c 147,7 ppm o qual refere-se aos carbonos simétricos da posição 3 e 5.

Foram observados ainda sinais em δ_c 98,8 (C-6), δ_c 93,8 (C-8), δ_c 105,7 (C-2'), δ_c 115,3 (C-5') e δ_c 121,3 (C-6') os quais, juntamente com os dados de ^{13}C corroboram com a identificação da estrutura proposta. Os sinais de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ em δ_c 101,2 ppm e δ_c 104,24 correspondem aos carbonos anoméricos da glicose e da ramnose, respectivamente.

A rutina (FIGURA 10) é um flavonóide pertencente a subclasse dos flavonóis. (MARCARINI, 2013). Uma combinação das vias chiquimato e acetato (principais vias dos compostos fenólicos) levam a biossíntese da rutina. A mesma se apresenta com um dissacarídeo (raminose + glicose) ligado a posição 3 do anel pirano. (PEDRIALI, 2008).

O flavonoide rutina foi detectado em diversos alimentos como na cebola, uva, trigo, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (BECHO J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O., 2009). Na família Primulaceae foi encontrado na *Labisia pumila*, sendo um dos compostos responsáveis pela ação antioxidante apresentada na espécie (JAAFAR, H.Z.E.; IBRAHIM, M.H., 2011) e por meio de CLAE a presença da rutina também foi observada na espécie *Lysimachia clethroides* Duby (SHIM et al, 2013).

Estudos realizados com a rutina apresentaram atividade terapêutica sob melhoria nos sintomas da hipertensão e doenças hemorrágicas (PATHAK et al., 1991), atividade antifúngica (HAN, Y. et al, 2009), antihiperlipidêmica (SANTOS et al., 1999), anticarcinogênica (MACHADO, H. et al, 2005), anti-inflamatória (GUARDIA, T. et al., 2001), hepatoprotetora (JANBAZ, A. et al, 2002).

O ácido gálico já foi detectado em espécies da família Primulaceae. No extrato aquoso da *Ardisia compressa* foi observado por meio de CLAE a presença do ácido gálico (CHANDRA, S.; MEJIA, E.G., 2004). Foi isolado na espécie *Ardisia colorata* (SUMINO et al, 2002) e representa um dos principais compostos fenólicos presente nas espécies *Labisia alata*, *Labisia pumila* e *Labisia lanceolata*. (JAAFAR, H.Z.E.; KARIMI, E., 2011).

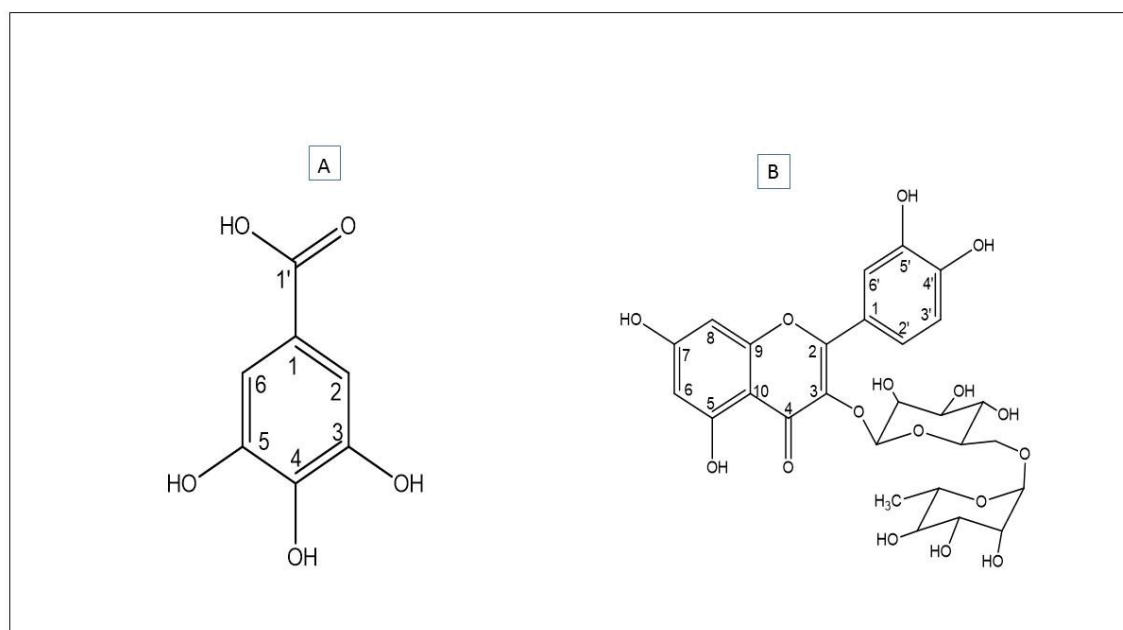
Werner et al (1999) sugeriu que a desidrogenação do ácido 5- desidrochiquimico (composto intermediário da via metabólica chiquimato) é a via principal para a obtenção do ácido gálico. Porém outras rotas metabólicas não podem ser excluídas. (GRUNDHOFER, P. et al, 2001).

O composto ácido gálico (3,4,5-tri-hidroxibenzóico) pode ser obtido pela hidrólise ácida de taninos hidrolisáveis, e possui uma variedade de substituintes em sua porção -COOR, gerando ésteres com propriedades farmacológicas diferentes. (LOCATELLI, C.; MONTEIRO, F.B.F.; PASA, T.B.C., 2013).

Estudos realizados com este composto apresentaram atividades anti-tumorais (LU, Y. et al, 2010; ISUZUGAWA et al, 2001; MA, J. et al, 2003), antioxidantes (KIM et al, 2002), anti-melanogênicas (KIM, Y.J. 2007), anti-inflamatória (COUTO, A. et al, 2012), antifúngica (PETRÔNIO et al, 2008), antibacteriana (GOMES, R.O.D., 2012).

A FIGURA 10 ilustra a estrutura química do ácido gálico e rutina identificado na espécie em estudo.

FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO E RUTINA



FONTE: O autor (2018)

LEGENDA: A – ácido gálico, B – rutina.

4.5 ESTUDO MORFOANATÔMICO

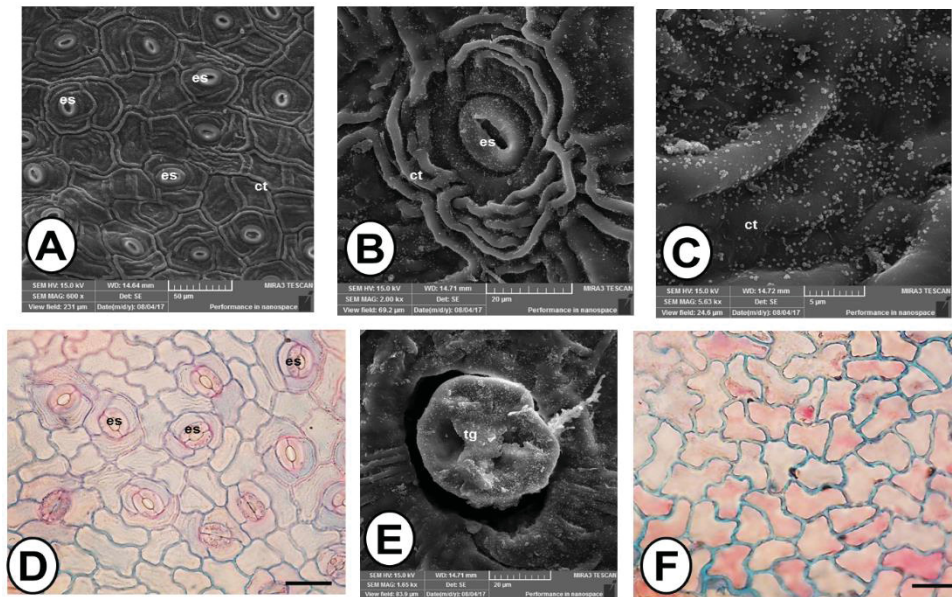
Morfológicamente as folhas de *Myrsine parvula* (FIGURA 11) medem aproximadamente 7,5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura, são elípticas, possuem ápice arredondado e base aguda. A margem é inteira e levemente revoluta na face abaxial. O pecíolo mede 1,2 cm, é glabro e canaliculado. A descrição da folha ocorreu de acordo com o material vegetal utilizado, e os relatos condizem com a descrição feita por Freitas e Kinoshita (2015).

FIGURA 11 – FOLHAS SECAS DA *Myrsine parvula*



FONTE: O autor (2016)

Na análise anatômica da lâmina foliar em vista frontal, as células epidérmicas apresentam paredes delgadas com formato levemente ondulado em ambas as faces (FIGURA 12 C e E) assim como *M. venosa* (LUNA, 2014). Na espécie estudada os campos de pontoação primária foram visíveis na face adaxial.

FIGURA 12 – VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA *Myrsine parvula*

FONTE: O autor (2017).

NOTA: A e B – estômatos e cutícula estriada face abaxial em MEV, C – face adaxial em MEV evidenciando cera epicuticular, D – face abaxial em MO, E – tricoma glandular em MEV, F – face adaxial em MO. BARRA = 50 µm D e F.

LEGENDA: ct: cutícula, es: estômato, tg: tricoma glandular, MEV: microscopia eletrônica de varredura, MO: microscopia óptica.

A epiderme é o sistema de revestimento do vegetal durante o crescimento primário e pode apresentar diferenças na sua ornamentação, presença ou não de estômatos, tricomas, células especializadas, entre outras. (RUDALL, 1994). Como a epiderme apresenta contato direto com o ambiente a mesma fica sujeita a alterações estruturais. (CUTTER, 1986).

A cutícula de *M. parvula* mostra-se estriada e ondulada na face abaxial e levemente estriada na face adaxial. No trabalho realizado por Freitas (2003) foram identificados 3 padrões de ornamentação relacionados à cutícula de espécies pertencentes ao gênero da planta em estudo, que podem se apresentar de forma ondulada e sem estrias como em *M. gardeneriana* A. DC., *M. monticola* Mart. e *M. venosa* A. DC., cutícula lisa como observado para *M. emarginella* Miq., *M. parvifolia* A. DC., *M. loefegrinii* (Mez) Imkhan e por fim cutícula ondulada e com estrias como em *M. coriacea* (Sw.) R. Br. Ex Roem & Schult, *M. lineata* (Mez) Imkhan, *M. lacifolia* Mart., *M. umbellata* Mart., *M. laetevirens* (Mez) Arechav. e *M. balansae* (Mez) Arechav.

A presença de cera epicuticular foi observada na espécie em estudo (FIGURA 12 C). De acordo com Freitas (2003) ceras epicuticulares não são observadas com frequência, mas foram verificadas em *M. umbellata* sob a forma de pequenos grânulos.

Os estômatos anisocíticos (FIGURA 12 D) são observados apenas na face abaxial o que caracteriza a folha como hipoestomática. Esses estômatos são observados no mesmo nível das células epidérmicas assim como em *M. venosa* e *M. coriaceae* (LUNA, 2014). Em torno dos estômatos, ocorrem estrias epicuticulares formando um anel. Essa característica foi descrita em outras espécies circunscritas no subclado *Myrsinoideae*, *Stylogyne depauperata*, *S. warmingii* e *S. pauciflora* (LUNA et al, 2013).

A descrição dos tricomas constitui uma importante característica no controle da qualidade da matéria-prima, levando em consideração principalmente quando este se apresenta rasurado, fragmentado ou mesmo pulverizado. (GUERREIRO et al., 2015).

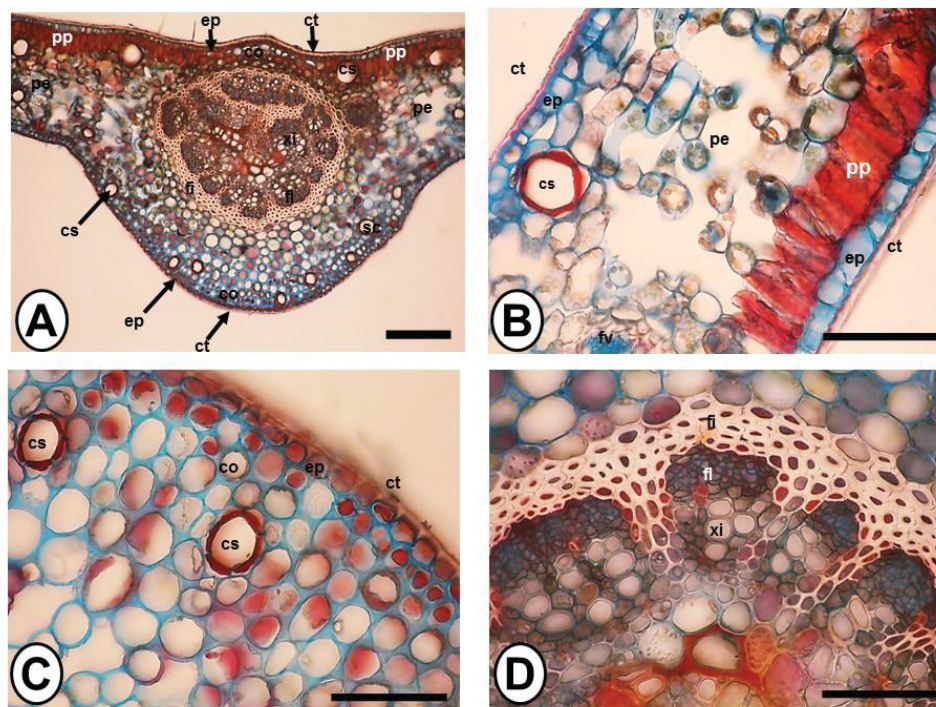
Tricomas glandulares são formados por duas porções, uma que se insere nas células epidérmicas (porção denominada de base) e outra que se encontra acima da superfície da epiderme, chamada de corpo. O corpo do tricoma é representado por um pedicelo, que é a porção que eleva as células secretoras, podendo ser formado por uma ou muitas células secretoras (FAHN, 1979; GONZALES; ARBO, 2004). Escassos tricomas glandulares foram observados na face adaxial de *M. parvula* através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Esse tipo de tricoma é observado em regiões de depressão da epiderme (FIGURA 12 E). Tricomas glandulares peltados foram observados nas duas faces de *M. coriaceae* e *M. venosa* (LUNA, 2014). A característica do tricoma foi usada por Otegui e Maldonado (1998) para caracterizar espécies de *Myrsine*, em que os tipos de tricomas foram identificados para diferenciar três espécies *Primula* (FICO et al., 2007). Lorence e Dwyer (1988) ao realizarem uma revisão de *Deppa* (Rubiaceae) afirmaram que o tipo, tamanho e distribuição de tricomas são caracteres importantes na identificação de espécies de plantas. No gênero *Myrsine* são encontrados também tricomas tectores como na *M. coriaceae* (FREITAS, 2003).

Em secção transversal, a epiderme mostra células isodiamétricas compactas (FIGURA 13 A), recobertas por cutícula delgada a qual reage positivamente à reação com Sudam III. Subjacente à epiderme ocorrem 3-4 camadas de colênquima angular (FIGURA 13 C) que apresenta idioblastos fenólicos que reagem ao cloreto férrico.

O mesofilo é dorsiventral (FIGURA 13 B) sendo formado por uma camada de parênquima paliçádico, e 7-9 estratos que compõe o parênquima esponjoso. Características semelhantes a estas, são descritas para *M. venosa* e *M. coriaceae* (LUNA, 2014). No entanto, diferente do relatado em literatura (LUNA, 2014; LUNA et al., 2013; FREITAS, 2003) não foram observados no mesofilo da espécie em estudo a presença de cristais e drusas de oxalato de cálcio.

Dispersas por toda a extensão do mesofilo são observadas células secretoras de substâncias de natureza lipofílica, com formato arredondado e feixes vasculares de pequeno porte (FIGURA 13 A-D). A presença de estruturas secretoras internas caracteriza a família Myrsenaceae e a diferencia das demais dentro da ordem Primulales sensu Cronquist (ANDERBELG; STAHL, 1995).

FIGURA 13 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL E MESOFILO DA FOLHA DA ESPÉCIE EM ESTUDO.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A – Visão geral da nervura central. B – Detalhes do mesofilo. C – Detalhes do colênquima. D – Detalhes do feixe vascular. BARRA = 100 µm A e 200 µm B, C e D.

LEGENDA: pp- parênquima paliçádico, ep- epiderme, ct-cutícula, cs-célula secretora, pe-parênquima esponjoso, co-colênquima, xi-xilema, fi-fibras, fl-floema.

De acordo com Esaú (1977) as estruturas secretoras encontradas em espécies da família Primulaceae podem ser divididas em externas e internas, sendo as externas tricomas glandulares, nectário extrafloral, hidratódios e hidatódios, e as internas podem ser idioblastos e cavidades secretoras.

Entre as variedades de *M. pumilum*, as células secretoras foram amplamente distribuídas na nervura central e no pecíolo *M. pumilum* var. *lanceolata* em comparação com *M. pumilum* var. *pumila* e var. *alata*. Muntereanu et al. (2011) revelaram que as células secretoras podem ser caracteres de diferenciação de espécies. De acordo com Teixeira et al. (2000), a micromorfologia e a localização do tecido secretor também tem sido utilizada por muitos autores em outras famílias como características úteis para taxonomia como por exemplo em *Lonchocarpus* Kunth (Fabaceae).

A composição química da substância das células secretoras é conhecida em *Ardisia* Sw., *Aegiceras* Gaertn., *Embelia* Burm. f., *Myrsine* e *Tapeinosperma* Hook f., onde derivados da hidroxibenzoquinona e substâncias lipofílicas foram relatadas (TUNTIWACHWUTTIKULO et al. 1997; OTEGUI et al. 1998).

As substâncias oriundas das células secretoras estão envolvidas em uma ampla gama de atividades farmacológicas, como antioxidantes (SUMINO et al., 2002), anti-inflamatórias (AHMAD et al., 2011), anti-helmínticos (CHALLAM et al., 2010) anti-noceptivas (HESS et al., 2010).

Dentre as substâncias encontradas nas células secretoras, estão os terpenos, comumente encontradas em espécies brasileiras de *Myrsine* (JANUÁRIO et al., 1992) e destacam-se pela atividade moluscicida (OHTANI et al., 1993; MANGURO et al., 1996; GITHIORI, et al., 2002). Além da ação antisséptica, os terpenos podem ainda atuar na atração de agentes polinizadores (FAHN, 1979). Sendo assim, essas espécies vegetais mostram potencial como fonte de produtos naturais bioativos.

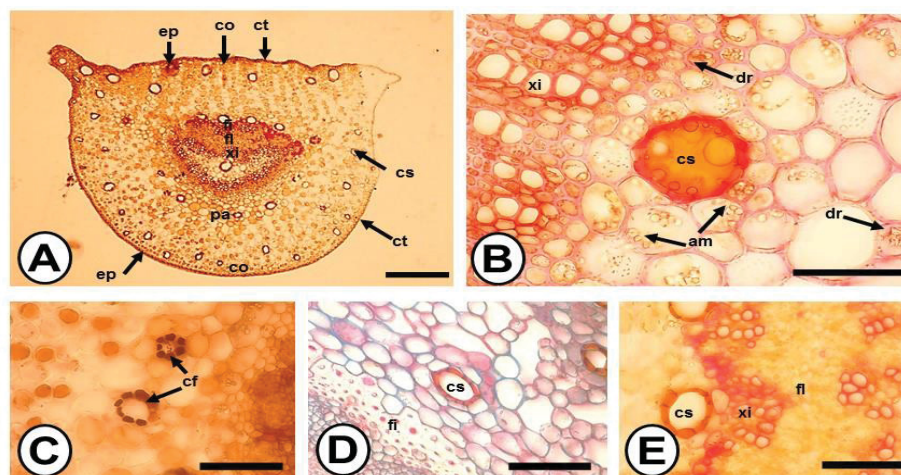
A nervura central da folha mostra formato biconvexo com maior proeminência na face abaxial (FIGURA 13 A). O formato da nervura central e do pecíolo em secção transversal das espécies vegetais tem se mostrado relevantes na identificação e diferenciação de espécies (AKINNUBI et al., 2013; WOSCH et al., 2015; BOBEK, 2016).

Segundo Metcalfe e Chalk (1950) a organização do feixe vascular em espécies de *Myrsine* é variável. No entanto na grande maioria das espécies ocorre uma bainha de fibras esclerenquimáticas que circunda o feixe vascular central assim como na espécie em estudo (FIGURA 13 A e C). As espécies de *Myrsine* estudadas por Freitas

(2003) apresentaram esta bainha esclerenquimática envolvendo o feixe vascular central lhes dando um aspecto ovalado ou em arco, porém a forma como os feixes se mostraram foi variável.

Em secção transversal, o contorno do pecíolo (FIGURA 14 A) tem formato plano na face adaxial e convexo na face abaxial. A epiderme é uniestratificada, no entanto, as células apresentam-se mais alongadas do que na folha. A cutícula é mais espessa com ausência de tricomas. Subjacente à epiderme encontra-se 3-4 camadas de colênquima angular. Essa característica vai ao encontro do descrito por Luna (2013) para as espécies *M. coriaceae* e *M. venosa*. Adjacente ao colênquima encontra-se o tecido parenquimático cujas células evidenciam formato circular. Nas células do parênquima fundamental são encontrados grãos de amido e drusas de oxalato de cálcio (FIGURA 14 B).

FIGURA 14 – SECÇÃO TRANSVERSAL E ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO PECÍOLO DE *Myrsine parvula*.



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A – Visão geral do pecíolo. B – duto contendo substância lipofílica. C – Compostos fenólicos. D e E detalhes do feixe vascular. E – reação com floroglucina clorídrica. Barra 100 µm A e 200 µm B, C e D. Barra 100 µm A e 200 µm B, C e D

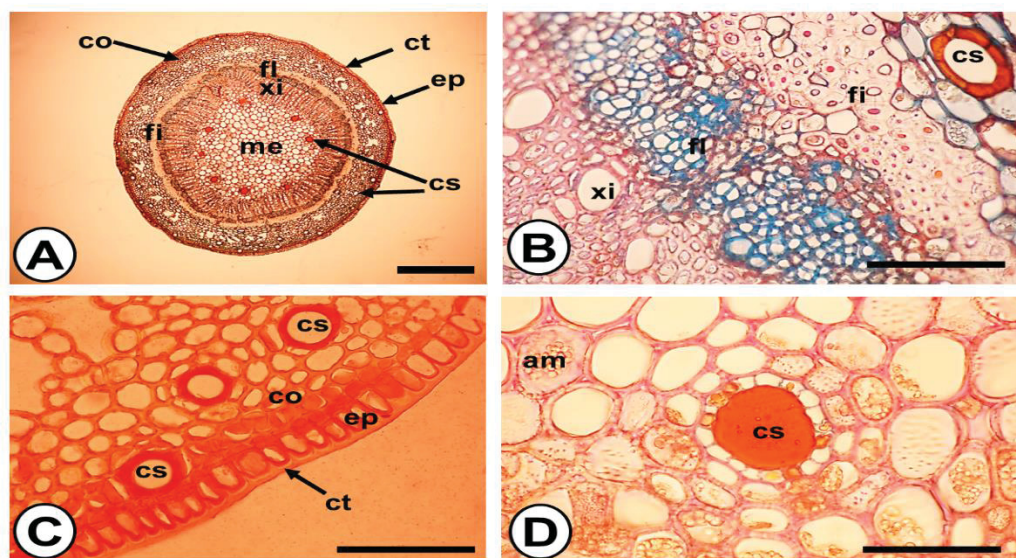
LEGENDA: ep- epiderme, ct-cutícula, cs-célula secretora, co-colênquima, xi-xilema, fi-fibras, fl-floema, dr-drusa, am-amido, cf-compostos fenólicos.

Células secretoras são encontradas imersas em todo o pecíolo (FIGURA 14 A). Essa característica é condizente ao descrito para *M. venosa*. As células secretoras, em secção transversal, têm formato circular e são formadas por epitélio secretor bem delimitado, e lúmen conspícuo (FIGURA 14 A-E). Assim como *M. venosa* (LUNA,

2013) observa-se célula secretora na porção interna do sistema vascular (FIGURA 14 A). O sistema vascular é colateral e arranja-se em forma de arco. O sistema vascular é circundado por uma bainha de fibras (FIGURA 14 A e 14 E).

O galho de *M. parvula* seccionado transversalmente apresenta formato circular (FIGURA 15 A). A epiderme é uniestratificada com células isodiamétricas alongadas no sentido periclinal (FIGURA 15 A e 15 C). A cutícula mostra-se espessa quando evidenciada por Sudam III (FIGURA 15 D). Não foi observada a presença de tricomas tectores ou glandulares.

FIGURA 15 – SECÇÃO TRANSVERSAL E ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO GALHO DA *Myrsine parvula*



FONTE: O autor (2017).

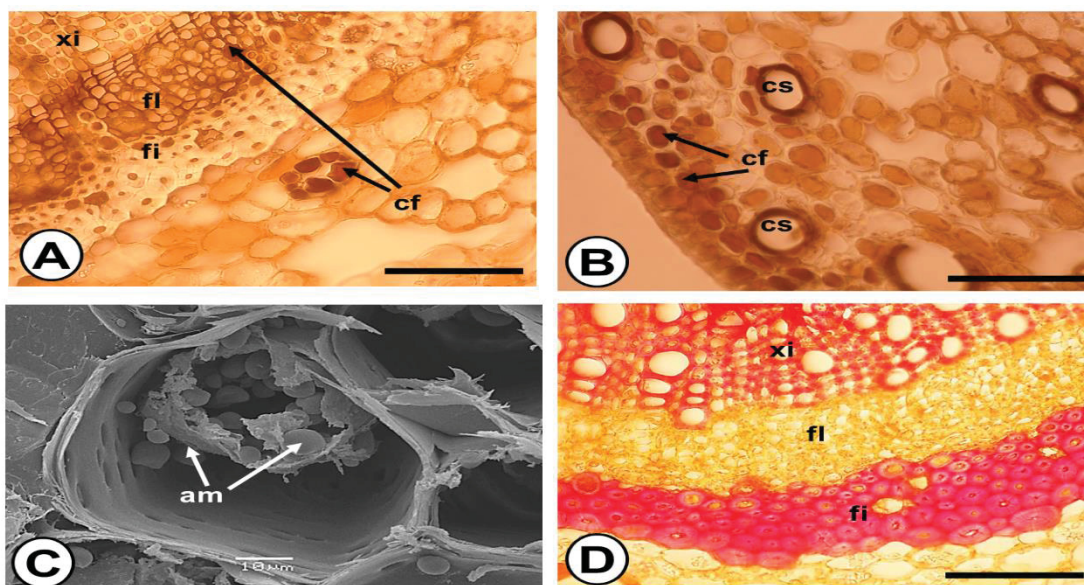
NOTA: A – Visão geral do galho em secção transversal. B – detalhes do feixe vascular. C – Cutícula em reação com Sudam III. D- Célula secretora com substância lipofílica. BARRA: 60µm A, 100µm C e 200µm B e D.

LEGENDA: ep- epiderme, ct-cutícula, cs-célula secretora, co-colênquima, xi-xilema, fi-fibras, fl-floema, am-amido.

Quanto à organização do galho, o córtex possui duas camadas de colênquima angular (FIGURA 15 C). Pode ser observada a presença de células que reagem positivamente com cloreto férrico (FIGURA 16 A e 16 B), além de células secretoras (FIGURAS 15 A-D e 16 A e B). As células apresentam-se normalmente esféricas e com conteúdo amarelado (FIGURA 15 D). Assim como na folha, nota-se bainha escleren-

química envolvendo o sistema vascular que reage positivamente a floroglucina clorídrica (FIGURA 16 D). No parênquima medular podem ser observados grãos de amido (FIGURA 16 C).

FIGURA 16 – DETALHES DO GALHO DA *Myrsine parvula*



FONTE: O autor (2017).

NOTA: A e B – Destaque para compostos fenólicos evidenciados por FeCl_3 . C- Grãos de amido em MEV. D– Detalhes do feixe com floroglucina clorídrica. BARRA: A e B 100 μm , D 200 μm .

LEGENDA: cs-célula secretora, xi-xilema, fi-fibras, fl-floema, am-amido, cf-compostos fenólicos.

A presença de compostos fenólicos detectados pode estar relacionada com a atividade antioxidante apresentada pela espécie, assim como a presença de flavonoides na análise fitoquímica. As células secretoras com substâncias lipofílicas podem indicar a presença de esteroides e triterpenos, como foram observados neste trabalho.

4.6 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

4.6.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

Os resultados apresentados pelas amostras avaliadas, expressos em relação à vitamina C e a rutina, ambas considerando 100% de atividade, se encontram na TABELA 11.

TABELA 11 – FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*

Amostra	Atividade antioxidante em relação a vitamina C (%) M±DP	Atividade antioxidante em relação a rutina (%) M±DP
VITAMINA C	100 ^{a5}	-
RUTINA	-	100 ^{a6}
BF	16,70±0,66 ^{a1}	63,42±2,53 ^{a4}
HF	14,81±0,90 ^{a1}	44,47±3,40 ^{a2}
CF	16,75±0,34 ^{a1}	50,25±0,68 ^{a2a3}
AEF	26,88±1,24 ^{a2 a3}	60,19±2,78 ^{a4}
RF	14,10±0,60 ^{a1}	31,57±1,35 ^{a1}
BG	34,41±0,69 ^{a3a4}	77,05±1,55 ^{a5}
HG	16,55±0,91 ^{a1}	49,67±3,47 ^{a2a3}
CG	17,21±0,54 ^{a1a2}	51,66±2,46 ^{a3}
AEG	50,35±0,80 ^{a4}	112,74±1,80 ^{a7}
RG	9,81±0,68 ^{a1}	29,46±2,37 ^{a1}

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente segundo o teste de Tukey (0,05).

As frações que apresentaram resultados mais significativos foram AEG (50,35%), BG (34,41%) e AEF (26,88%), obtendo valores consideráveis de atividade antioxidante em relação à vitamina C.

Ao comparar com o padrão rutina a fração AEG demonstrou maior atividade antioxidante, seguida do extrato BG, BF e AEF com 112,74, 77,05, 63,42 e 60,19% respectivamente.

É possível observar que os resultados da folha e galho se confirmam, onde as maiores atividades ocorrem nas mesmas frações tanto para a rutina quanto para a

vitamina C. Este fato pode estar relacionado ao perfil cromatográfico semelhante apresentado por ambos.

A fração remanescente da folha e galho apresentaram menor atividade tanto em relação a vitamina C quanto para a rutina. Em contrapartida as frações acetato de etila e extrato bruto do galho e folha obtiveram os maiores percentuais de atividade antioxidante por este método.

Todos os extratos e frações apresentaram uma atividade antioxidante menor em relação ao ácido ascórbico do que para a rutina, podendo levar em consideração neste caso o fato da rutina ser um flavonoide e se aproximar estruturalmente das amostras. Porém vale ressaltar que as capacidades antioxidantes da vitamina C e rutina são diferentes.

4.6.2 Redução do radical DPPH

A capacidade antioxidante das amostras testadas se baseia na redução de 50% do radical DPPH, observado pela regressão linear, sendo considerado confiável o valor de R^2 (linearidade da reta) superior a 0,80. (MENSOR et al, 2001).

Os resultados das amostras e controles capazes de reduzir 50% do radical DPPH são representados na TABELA 12.

Por meio da análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) das 10 amostras testadas foram obtidos 9 grupos que diferem entre si estatisticamente.

TABELA 12 – RESULTADO DA REDUÇÃO DE 50% DO RADICAL DPPH PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*.

AMOSTRA	IC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	Classificação do teste de Tukey*	
VITAMINA C	4,80	a ¹	
RUTINA	5,60	a ¹	a ²
AEF	6,10		a ²
AEG	8,10		a ²
CG	27,0		a ³
HG	28,5		a ³
BG	36,0		a ⁴
HF	40,0		a ⁵
CF	54,2		a ⁶
RG	69,0		a ⁷
BF	79,3		a ⁸
RF	90,0		a ⁹

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG).

*amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, pelo teste de Tukey.

As frações acetato de etila da folha e galho apresentaram maior atividade antioxidante pelo método de redução do DPPH pois necessitam de uma quantidade menor de amostra (6,1 e 8,1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente) para reduzir a concentração inicial do radical pela metade. As presenças de flavonoides nestas frações podem estar relacionadas a esta ação. A identificação da rutina na fração AEF pode ser percebida pela semelhança no resultado comparado a rutina utilizada como padrão, conhecida por sua ação antioxidante.

Algumas espécies da família da planta em estudo apresentaram atividade antioxidante por meio da redução do radical DPPH, a *Labisia pumila* (MOHD et al, 2014), espécies *Ardisia* (NEWELL et al, 2010) e *Primula auriculata* (JABERIAN et al, 2013).

Tanto a folha quanto o galho da *Myrsine parvula* apresentaram boa ação antioxidante pelos métodos empregados. No complexo do fosfomolibdênio os compostos lipofílicos e hidrofílicos foram avaliados e no ensaio de redução do DPPH, o poder redutor de radicais livres dos compostos presentes na amostra pôde ser observado.

4.7 TOXICIDADE *in vitro*

4.7.1 Toxicidade frente à *Artemia salina*

Os resultados obtidos dos extratos e frações no ensaio da *Artemia salina* se encontram na TABELA 13.

TABELA 13 – MORTALIDADE E CL50 DA *Artemia salina* FRENTE AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA *Myrsine parvula*

(continua)

Amostra	CL 50 $\mu\text{g/ml}$ (LI - LS)	χ^2 (qui-quadrado)
BF	111,7 (48,6 - 259,0)	11,68
CF	108,7 (71,4 - 199,8)	11,87

TABELA 13 – MORTALIDADE E CL50 DA *Artemia salina* FRENTE AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA *Myrsine parvula*

(conclusão)

Amostra	CL 50 µg/mL (LI - LS)	x ² (qui-quadrado)
HF	179,1 (127,6 - 288,2)	10,68
AEF	370,7 (275,4 - 673,7)	3,27
RF	> 1000	
BG	> 1000	
HG	268,5 (200,6 - 444,9)	2,90
CG	> 1000	
AEG	> 1000	
RG	> 1000	
SQ	56,8 (44,9 - 68,7)	
Metanol	> 1000	

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG), LI= limite inferior, LS= limite superior, CL= concentração letal, SQ= Sulfato de quinidina; Mortalidade indicada como o número de náuplios mortos após 24 horas.

De acordo com Meyer et al (1982) as amostras que apresentam CL50 < 1000 µg/mL podem ser consideradas tóxicas. Outra avaliação mais detalhada foi descrita por Amarante et al (2011), sendo considerada de baixa toxicidade a amostra que obtiver CL50 > 500 µg/mL, toxicidade moderada CL50 entre 100 µg/mL a 500 µg/mL e alta toxicidade CL50 < 100 µg/mL.

Os resultados demonstraram que o extrato bruto do galho, as frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente do galho, assim como a fração remanescente da folha podem ser livres de toxicidade sobre o organismo testado. Já o extrato bruto da folha e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila da folha e a fração hexano do galho são consideradas tóxicas, segundo a classificação de Meyer e colaboradores (1982).

Dentro da classificação de Amarante et al (2011) o extrato bruto da folha, frações hexano, clorofórmio, acetato de etila da folha e a fração hexano do galho são consideradas moderadamente tóxicas pois se encontram na faixa CL₅₀ de 100 a 500 µg/mL.

O estudo realizado por Jaramillo, C.J. et al (2016) avaliou a relação dos metabólitos secundários presentes em algumas plantas medicinais com a ação citotóxica apresentada nos bioensaios de *Artemia salina*. Foi observada alta toxicidade contra o microcrustáceo nas plantas que apresentaram maior concentração de alcaloides, e redução na toxicidade devido a maior concentração de polifenóis. As saponinas presentes atuaram em sinergismo com os polifenóis na redução da toxicidade, porém de maneira contrária quando se associaram aos alcaloides e heterosídeos cianogênicos, aumentando a toxicidade.

Isolados de terpenos apresentaram atividade tóxica frente à *Artemia salina* segundo teste realizado em espécies de algas marinhas. (EDRADA et al, 2000). Outro indicativo de toxicidade foi descrito no bioensaio realizado com extrato clorofórmico e metanólico da espécie *Baccharis pseudotenuifolia* por meio da presença de triterpenos e flavonoides. (MOREIRA, F.P.M et al, 2003).

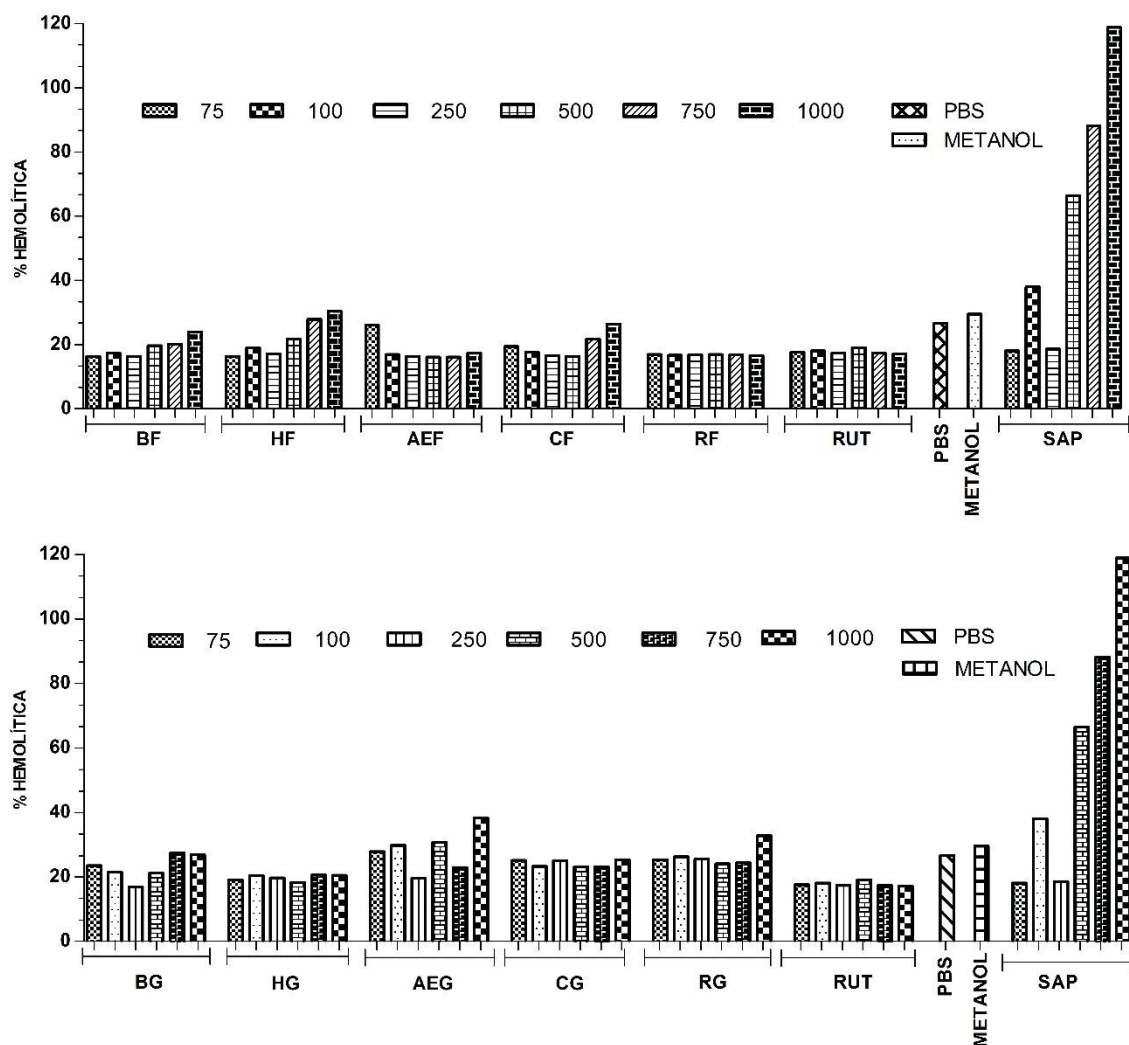
Na família Primulaceae, 8 espécies do gênero *Cyclamen* apresentaram toxicidade frente à *A. salina*, sendo a saponina o metabólito secundário indicado como possível responsável por essa ação. (DUSEN et al 2016).

A presença de taninos condensados e esteroides e triterpenos na *Myrsine parvula* podem ser os responsáveis pela ação tóxica observada no extrato bruto e frações clorofórmio, hexano e acetato de etila da folha, e igualmente na fração hexano do galho. Na fração acetato de etila da folha foi onde se observou a menor toxicidade, podendo estar relacionada à maior concentração de flavonóides presentes nesta fração. A fração clorofórmio e bruto da folha foram as que apresentaram maior toxicidade.

4.7.2 Atividade hemolítica

Os extratos e frações da espécie em estudo foram submetidos ao ensaio de atividade hemolítica nas concentrações de 75, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL e os resultados se encontram no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA NO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG), Rutina (RUT) e Saponina (SAP).

Ao comparar os resultados obtidos com os controles negativos metanol e PBS e da mesma forma com os dois padrões (rutina como padrão negativo de hemólise devido sua ação antioxidante protetora (HENNEBERG, R. 2013; OLIVEIRA, D.G. 2001) e a saponina padrão positivo) verificamos que não houve formação de hemólise total nas amostras testadas. Em todos os eppendorfs ocorreu a formação de depósitos

TABELA 14 – PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO DA *Lactuca sativa* FRENTE À ESPÉCIE *Myrsine parvula*.

(conclusão)

Germinação (%)							
Tratamento	500 µg/mL	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL
CF	85,0% ^b	70,0% ^a	90,0% ^b	90,0% ^b	90,0% ^b	75,0% ^a	80,0% ^a
AEF	90,0% ^b	95,0% ^b	85,0% ^b	95,0% ^b	100% ^b	85,0% ^b	95,0% ^b
RF	65,0% ^a	95,0% ^b	70,0% ^a	90,0% ^b	80,0% ^a	100% ^b	100% ^b
CG	80,0% ^a	90,0% ^b	80,0% ^a	90,0% ^b	95,0% ^b	60,0% ^a	95,0% ^b
AEG	90,0% ^b	90,0% ^b	90,0% ^b	100% ^b	75,0% ^a	95,0% ^b	100% ^b
RG	95,0% ^b	90,0% ^b	90,0% ^b	100% ^b	100% ^b	85,0% ^b	65,0% ^a
Controle ÁGUA 85,0% ^b							

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente segundo o teste de Scott-Knott (0,05).

Não houve diferença estatística entre o grupo controle água destilada e metanol, sendo assim o solvente utilizado no ensaio não influenciou nos resultados.

No extrato BF foi observado diferença estatística na porcentagem de germinação nas concentrações de 400, 300 e 100 µg/mL em relação ao grupo controle água, com maior redução na porcentagem em 300 µg/mL e menor em 400 µg/mL. Não houve alterações no IVG quando comparado aos grupos controles água e metanol. A fração HF apresentou diferença estatística somente na concentração de 100 µg/mL com porcentagem de germinação menor que o controle, indicando inibição e não houve alteração no IVG nesta fração. Na fração CF as concentrações 400, 50 e 25 µg/mL apresentaram redução na porcentagem da germinação, sendo a maior redução em 400 µg/mL e menor em 25 µg/mL e ocorreu inibição no IVG em todas as concentrações sendo a maior em 300, 25, 500, 200, 400, 50 e 100 µg/mL. Já na fração AEF não foi observado diferença estatística na germinação em relação ao grupo controle, porém no IVG houve inibição apenas na concentração de 300 µg/mL. Na fração RF ocorreu

alteração tanto na porcentagem da germinação (redução em 500, 300 e 100 µg/mL) quanto no IVG inibindo em 300, 100, 500 e 400 µg/mL respectivamente.

TABELA 15 – IVG DA *Lactuca sativa* L. FRENTE AOS EXTRATOS E FRAÇÕES DA *Myrsine parvula*

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)							
Tratamento	500 µg/mL	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL
Amostra							
BF	2,12 ^a	2,43 ^a	1,81 ^a	2,41 ^a	2,10 ^a	2,17 ^a	2,46 ^a
HF	2,70 ^a	2,73 ^a	2,47 ^a	2,85 ^a	2,23 ^a	2,85 ^a	2,55 ^a
BG	1,81 ^a	2,22 ^a	2,25 ^a	2,34 ^a	2,27 ^a	1,93 ^a	2,16 ^a
HG	2,90 ^a	1,75 ^a	3,24 ^a	2,33 ^a	2,09 ^a	2,52 ^a	2,64 ^a
Controle ÁGUA 2,45^a							
Controle METANOL 3,20^a							
CF	2,24^b	2,34^b	2,09^b	2,33^b	2,70^b	2,54^b	2,15^b
AEF	3,16 ^a	3,28 ^a	1,93^b	2,74 ^a	3,00 ^a	2,62 ^a	3,44 ^a
RF	2,05^b	2,32^b	1,68^b	3,29 ^a	1,89^b	3,10 ^a	3,45 ^a
CG	2,02^b	2,36^b	2,29^b	2,99 ^a	2,80 ^a	1,59^b	3,33 ^a
AEG	3,66 ^a	2,86 ^a	2,89 ^a	3,72 ^a	2,54^b	3,05 ^a	3,84 ^a
RG	3,16 ^a	3,54 ^a	3,10 ^a	3,26 ^a	2,91 ^a	2,95 ^a	2,01^b
Controle ÁGUA 2,72^a							
Controle METANOL 3,31^a							

FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG).

Médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente segundo o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O extrato BG demonstrou diminuição na germinação apenas na concentração de 25 µg/mL e no IVG não houve diferença estatística em nenhuma concentração. Na fração HG a diminuição da germinação ocorreu em 100 e 400 µg/mL, e não houve alterações estatisticamente significativas no IVG. A fração CG diminuiu a porcentagem da germinação em 50, 300 e 500 µg/mL, e inibiu o IVG em 50, 500, 300 e 400 µg/mL. Na fração AEG tanto a porcentagem de germinação quanto no IVG houve diferença estatística somente na concentração de 100 µg/mL. Por fim na fração RG a diminuição da porcentagem da germinação e inibição do IVG ocorreu somente na menor concentração de 25 µg/mL.

Analisando os resultados podemos perceber que as alterações provocadas na germinação e no IVG não são dose dependente, portanto em algumas frações as maiores concentrações apresentaram resultados menos expressivos que as menores concentrações. As frações clorofórmicas se destacam com maior ação inibitória, podendo esta ação estar relacionada à presença de flavonóides e esteroides/triterpenos presentes nestas frações.

4.8.2 Crescimento

Os resultados do crescimento da radícula e hipocótilo da alface frente ao extrato e frações da folha e galho da *Myrsine parvula* se encontram ilustrados nos GRÁFICOS 2 e 3.

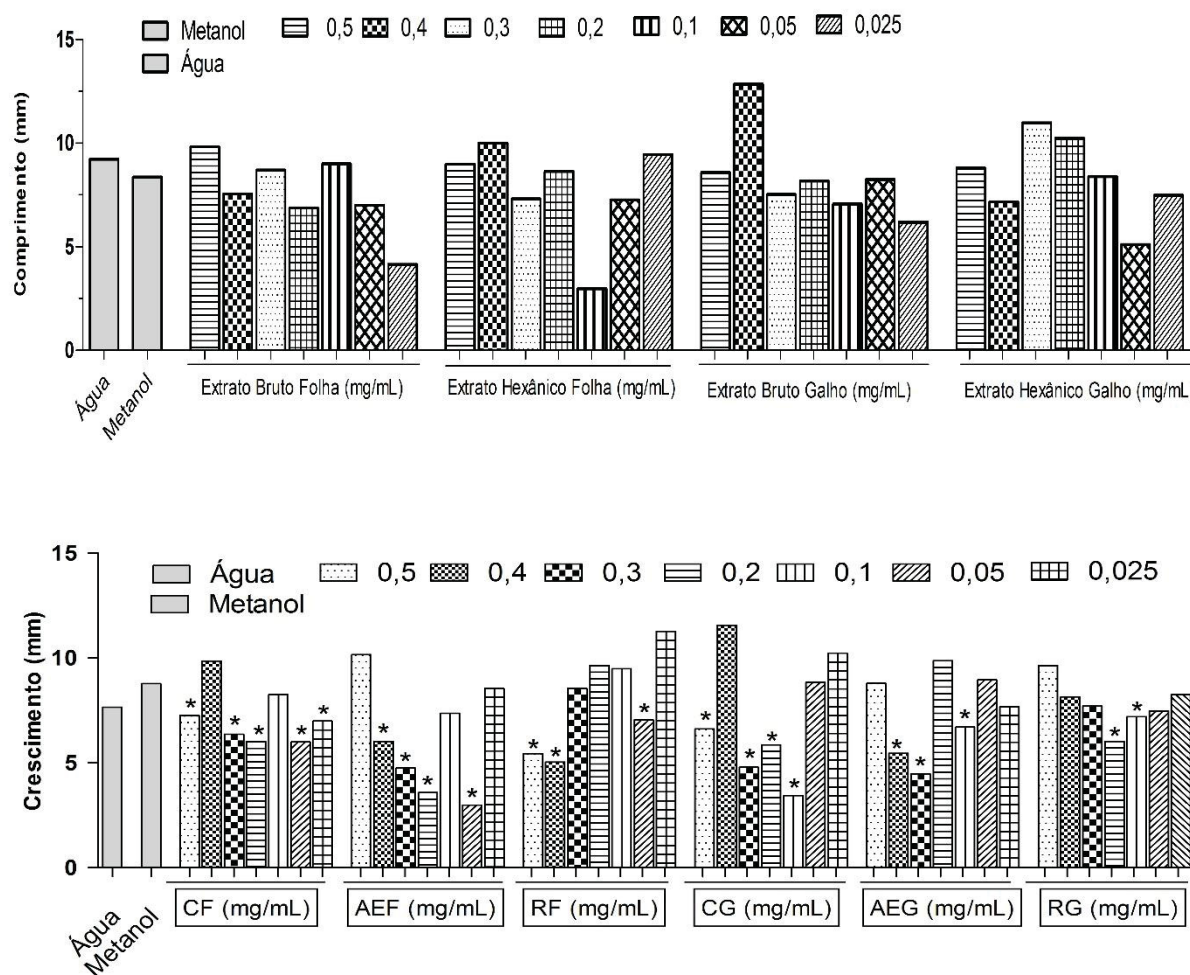
No extrato BF não foi observada diferença estatística no crescimento da radícula, ao contrário do hipocótilo que sofreu a maior inibição em 50 µg/mL, seguida da concentração de 100, 25 e 300 µg/mL. A fração HF apresentou diferença estatística na inibição do crescimento do hipocótilo na concentração de 100 µg/mL em relação aos grupos controles e em relação às demais concentrações da amostra, porém não houve alterações no crescimento da radícula. Na fração CF houve inibição no crescimento da radícula em 50, 200, 300, 25 e 500 µg/mL e no hipocótilo nas concentrações 200, 500, 50, 100 e 25 µg/mL. A fração AEF apresentou diferença estatística no crescimento da radícula e hipocótilo, em ambos com inibição, sendo na radícula em 50, 200, 300 e 400 µg/mL e no hipocótilo 50, 200, 100 e 300 µg/mL. Na fração RF a inibição na radícula foi em 400, 500 e 50 µg/mL e no hipocótilo em 500 e 400 µg/mL.

No extrato bruto e fração hexano da folha a inibição ocorreu somente no crescimento do hipocótilo, já nas frações acetato de etila, clorofórmio e remanescente da folha, tanto o crescimento do hipocótilo quanto da radícula foi afetado pela inibição.

No extrato BG não foi observado diferença estatística no crescimento da radícula, porém no hipocótilo ocorreu inibição em 300, 200, 500 e 25 µg/mL. A fração HG apresentou inibição somente no crescimento do hipocótilo em 100, 50 e 500 µg/mL. Na fração AEG a inibição da radícula foi em 300, 400 e 100 µg/mL, já no hipocótilo em 400, 300, 100 e 25 µg/mL. A radícula sofreu inibição na fração CG nas concentrações de 100, 300, 200 e 500 µg/mL e no hipocótilo em 200, 500, 300 e 50

$\mu\text{g/mL}$. A fração RG apresentou inibição na radícula em 200 e 100 $\mu\text{g/mL}$ e no hipocótilo em 25, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$.

GRÁFICO 2 – CRESCIMENTO DA RADÍCULA DE *Lactuca sativa* FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*.



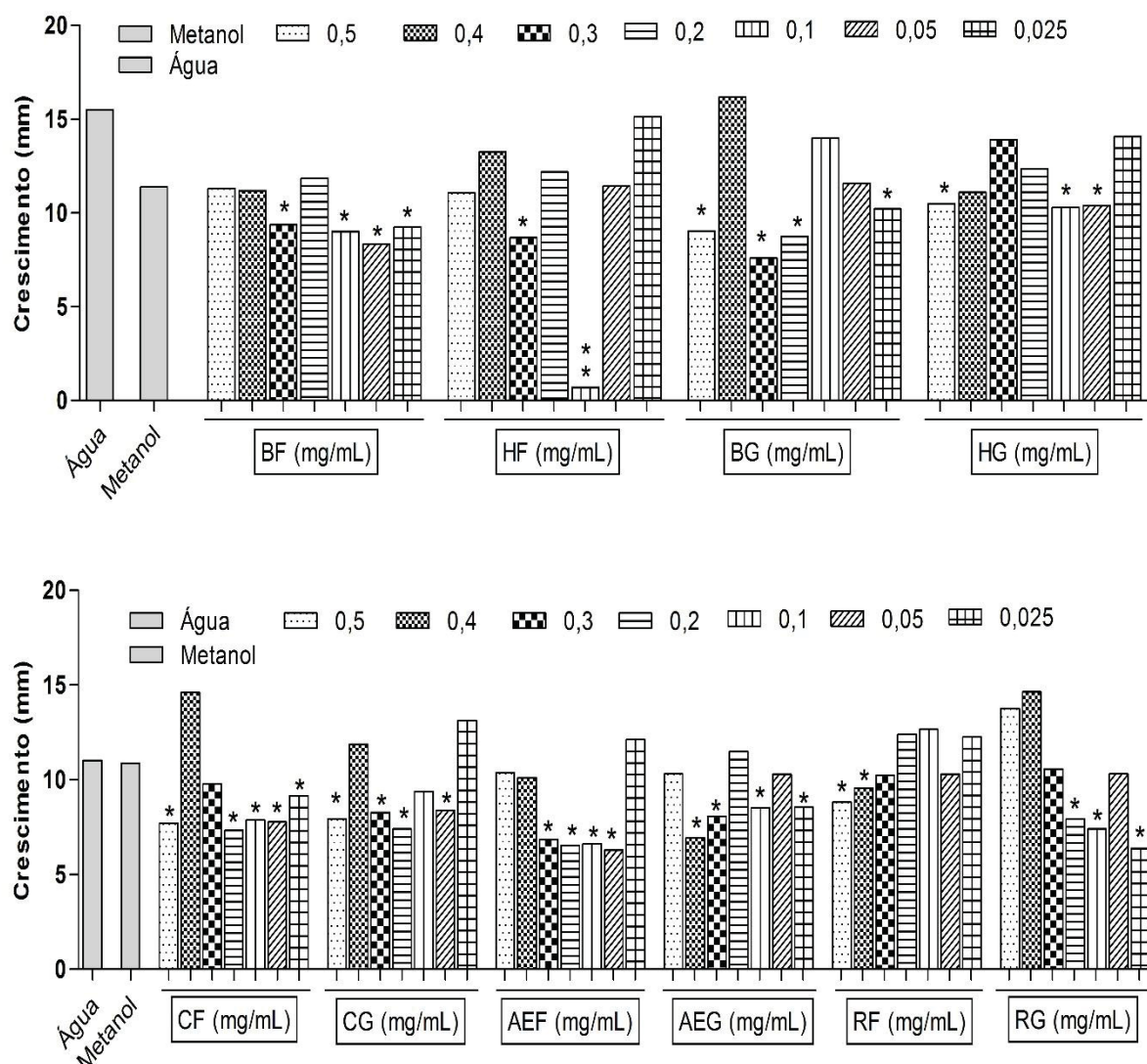
FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG),

Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Clorofórmio galho

(CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG). *diferem estatisticamente dos grupos controles água e metanol segundo teste Scott-Knott (0,05)

GRÁFICO 3 – CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO DA *Lactuca sativa* FRENTE AOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DA FOLHA E GALHO DA *Myrsine parvula*.



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Bruto folha (BF), Hexano folha (HF), Bruto galho (BG), Hexano galho (HG), Clorofórmio galho (CG), Clorofórmio folha (CF), Acetato de etila folha (AEF), Remanescente folha (RF), Clorofórmio galho (CG), Acetato de etila galho (AEG), Remanescente galho (RG). *diferem estatisticamente dos grupos controles água e metanol segundo teste Scott-Knott (0,05)

Semelhante aos resultados demonstrados pela folha, o extrato bruto e hexano do galho alterou o crescimento somente do hipocótilo, inibindo-o, porém nas frações acetato de etila, clorofórmio e remanescente do galho a inibição ocorreu na radícula e no hipocótilo.

No ensaio de crescimento foi observado alterações de inibição tanto da radícula quanto do hipocótilo e estas inibições não são dose dependente. A ação inibitória

provavelmente está relacionada à mistura dos compostos presentes na folha e galho da espécie em estudo (esteroides/triterpenos, taninos condensados, flavonóides). A fração clorofórmio da folha e galho foram as mais expressivas no processo de inibição do crescimento da radícula e do hipocótilo.

Conforme relatos de outros estudos, o efeito mais comum provocado por extratos sobre o crescimento inicial é a redução, ou seja, inibição do eixo hipocótilo-raiz da planta alvo. (AQÜILA, M.E.A. 2000; RODRIGUES, K.C.S., 2002). Segundo Reigosa et al (1999) os efeitos dos aleloquímicos nos processos fisiológicos de uma planta dependem da concentração, causando ativações em baixas concentrações e inibições em altas concentrações. Porém também é comum os efeitos chamados “em serra” (inibições em baixas concentrações e promoções em altas concentrações) devido ao reflexo da quantificação dos efeitos secundários sobre a soma não-linear dos vários efeitos no nível primário da planta. Cada processo fisiológico apresenta uma resposta diferente a certas doses de cada aleloquímico especificamente. (SILVA, F.M.; AQUILA, M.E.A., 2006).

Os principais grupos do metabolismo secundário com potencial aleloquímico segundo Wallet et al (1999) são as fitoalexinas, flavonoides, isoflavonoides, chalconas, auronas e xantinas, flavonas, flavonois, e seus glicosídeos, ligninas, monoterpenos e monoterpenóides, naftoquinonas, antraquinonas, estilbenos, fenantrenos, poliacetilenos, policetonas, saponinas, sesquiterpenos e sesquiterpenoides, taninos, triterpenos e triterpenóides.

De acordo com Baratelli, T.G. (2006) não há uma classe química definida de compostos aleloquímicos, porém de modo geral os dois grupos mais investigados por apresentarem potencial alelopático são os compostos fenólicos e os terpenóides. A ação alelopática pode ser causada por uma interação de vários aleloquímicos, e essa sinergia pode ter influência significativa mesmo em baixas concentrações.

Portanto a presença de metabólitos secundários como os flavonoides, esteroides e triterpenos, taninos condensados, antraquinona e iridóides observados na análise fitoquímica da *Myrsine parvula* podem ser os responsáveis pelos efeitos alelopáticos encontrados.

5) CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho realizado nesta dissertação contribuiu para o conhecimento da *Myrsine parvula* (Primulaceae). Podendo ser considerado um estudo inédito, visto que somente se conhecia o levantamento florístico e o estudo taxonômico da espécie.

Na pesquisa fitoquímica qualitativa foram detectadas as seguintes classes de metabólitos secundários: flavonoides, esteroides/triterpenos, taninos, antraquinona e iridoide. Na fração acetato de etila da folha foram identificados por meio de RMN dois compostos fenólicos: a rutina e o ácido gálico pela primeira vez na espécie.

O estudo morfoanatômico deve permitir a caracterização e diferenciação da espécie, devido a mesma ser facilmente confundida por outras do mesmo gênero, atribuindo o perfil botânico e químico.

Resultados significativos de propriedade antioxidante apresentados pela espécie nos ensaios testados, destacando as frações acetato de etila da folha na qual foi detectado a presença dos compostos fenólicos e galho com valores estatisticamente semelhantes ao padrão utilizado.

Toxicidade *in vitro* moderada frente ao microcrustáceo *Artemia salina* apresentada pelo o extrato bruto da folha e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila da folha e a fração hexano do galho. Já no bioensaio com as hemácias de carneiro nenhuma amostra demonstrou atividade hemolítica.

Atividade alelopática foi apresentada pelas amostras da folha e galho da espécie reduzindo o crescimento da radícula e hipocótilo da semente de alface (*Lactuca sativa*). Sendo as frações clorofórmicas aquelas com ação mais acentuada.

Analisando os resultados obtidos neste estudo, a moderada toxicidade e alto poder antioxidante da *Myrsine parvula*, assim como seu efeito alelopático, fazem desta planta um excelente alvo para pesquisas *in vivo*, contribuindo com outros resultados inéditos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, B. et al. Insecti-cidal, brine shrimp cytotoxicity, antifungal and nitric oxide free radical scav-enging activities of the aerial parts of *Myrsine africana* L. **African Journal Biotechnology**, v.10, n. 8, p. 1448–1453, 2011.
- AKINNUBI, M.F. et al. Petiole anatomy of some species of Asteraceae in southwest Nigeria. **African Journal of Plant Science**, v.7, n.12, p.608-612, 2013.
- ALADDIN, N.A et al. Comparative study of three Marantodes pumilum varieties by microscopy, spectroscopy and chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2016.
- ALAM, N. et al. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Bangladesh. v.21, p.143-152, 2013.
- ALBUQUERQUE, M. et al. Allelopathy na alternative tool to improve croopping systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, n. 21, p. 379-395, 2011.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- AMARANTE, C.B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardialinifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p.431 – 434, 2011.
- ANDERBERG, A.A. STAHL, B. Phylogenetic interrelationships in the Order Primulales, with special emphasis on the family circumscriptions. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1699-1730, 1995.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.66, n.1, p. 1-9, 2007.
- ASLAM, F. et al. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS profiling of *Carissa carandas* roots. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 4, p. 567-578, 2011.
- ASSAD, L. Doenças negligenciadas estão nos países pobres e em desenvolvimento. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 1, p. 6-8, 2010.
- AQÜILA, M. E. A. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. **Iheringia, Série Botânica**, v. 53, p. 51-66, 2000.
- AZAM, S.; BASHIR,S.; AHMAD, B. Anti-spasmodic action of crude methanolic extract and a new compound isolated from the aerial parts of *Myrsine africana*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Paquistão, v. 11, n. 55, p. 1-6, 2011.

- BARATELLI, T.G.de. **Estudo das propriedades alelopáticas vegetais: investigação de substâncias aleloquímicas em Terminalia catappa L. (Combretaceae)**. 2006. 199 f. Dissertação – (Mestrado em Química de Produtos Naturais), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R. Role of benzoxazinones in allelopathy byrye (*Secale cereale*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, p. 889-906, 1987.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAUER, D. Fenologia de três espécies de Myrsine L. em floresta secundária semidecídua no sul do Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa - MG, v. 36, n. 5, p. 859-868, 2012.
- BECHO J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutina – Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1, n.1, p. 21-25, 2009.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. **Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos**, v. 1, p. 305, 1976.
- BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, 2010.
- BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.
- BOBEK et al. Comparative analytical micrographs of “vassouras” (*Baccharis*, Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, n.6, p. 665-672, 2016.
- BOSE, U. et al. Antinociceptive, cytotoxic and antibacterial activities of *Cleome viscosa* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Australia, v. 21, n.1, p.165-169, Jan./Feb. 2011.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, volume 1**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm> Acesso em: 05 maio 2016.
- BURGER, M.C. de M. et al. Ácido myrsinoico e derivado: inibidores da fotossíntese *in vitro*. **Química Nova**, Brasil, v. 35, n. 7, p. 1395-1400, 2012.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, set. 2003.
- CAMPOS, R. **Estudos fitoquímico, de propriedades antioxidantes, de toxicidade preliminar e de atividade anti-inflamatória de Bauhinia glabra JACQ. (Fabaceae)**. 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

CARMO, F. M. S.; BORGES, E. E. L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n.3, 2007.

CARVALHO, J. L. C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001

CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL (CRIA) – SPECIES LINK. *Myrsine parvula*. 2016. Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt> >. Acesso em: 25 ago. 2016.

CHALLAM, M.; ROY, B.; TANDON, V. Effect of *Lysimachia ramosa* (Primulaceae) on helminth parasites: motility, mortality and scanning electron microscopic observations on surface topography. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 214-218, 2010.

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (Camellia sinensis) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

COUTO, A.G. et al. Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n.1, p. 124-131, 2013.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: células e tecidos**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 1986.

DHANJAL J.K. et al. Embelin inhibits TNF- α converting enzyme and cancer cell metastasis: molecular dynamics and experimental evidence. **BioMed Central Cancer**, Índia, v. 14, n. 775, 2014.

DIAS, J.F.G. et al. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.220-223, 2005.

DUSEN, S. et al. In vitro cytotoxic activities of *Cyclamen* L. (Primulaceae) ethanol extracts from Turkey. **Fresenius Environmental Bulletin**, Turkey, v. 25, n. 12, p. 6224-6228, 2016.

EDRADA, R. A. et al. Bioactive Terpenes from the Soft Coral *Heteroxenia* sp. from Mindoro, Philippines. **Zeitschrift für Naturforschung**, Germany, v. 55, p. 82-86, 2000.

ELAKOVICH, S.D. Biossays applied to allelopathic herbaceous vascular hydrophytes. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. & FOY, C.L. **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p.45-56.

ESAÚ, K. **Anatomy of seed plants**. New York: John Wiley & Sons, p. 550, 1977.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. Academic Press, p. 301, 1979.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2003. p. 263-288.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FICO et al. Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian *Primula* species. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1683-1691, 2007.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FOUBERT, K. et al. LC-MS Analysis of 13,28-Epoxy-Oleanane Saponins in *Maesa* spp. Extracts with Antileishmanial Activity. **Phytochemical Analysis**, Belgium, n.20, p. 159–167, 2009.

FREITAS, M.F.; CARRIJO, T.T. *Primulaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB121874>>. Acesso em: 15 jul. 2016

FREITAS, M. F. de; KINOSHITA, L. S. Myrsine (Myrsinoideae- Primulaceae) no sudeste e sul do Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 66, p. 167-189, 2015.

FREITAS, M. F. de. **Estudo taxonômico das espécies de Myrsine L. (Myrsinaceae) nas regiões sudeste e sul do Brasil**. 2003. 235 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FUCHS, C.H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology**, v. 38, p. 141-144, 1963.

FUNDAÇÃO e INPE divulgam dados do Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica no período de 2014 a 2015. **Fundação SOS Mata Atlântica**. São Paulo, 25 maio. 2016. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

GANDHI, V.M.; CHERIAN, K.M. Red cell haemolysis test as an *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicology In Vitro**, v. 14, p. 513-516, 2000.

GIRARDI, C. et al. Biological activities of 13, 28-epoxyoleanane triterpene saponins from two peruvian myrsinaceae. **Revista Sociedade Química do Peru**, Lima, v.3, n. 78, p. 188-197, 2012.

GITHIORI et al. Anthelmintic activity preparations derived from *Myrsine africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2, p. 187-191, 2002.

GOMES, R.O.D. **Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli***. 2012. 38f. Memoria de título (Engenheiro Agrônomo com menção em Enologia) – Faculdade de Ciências Agrônomas, Universidade do Chile, Santiago, 2012.

GONZALEZ, A. M.; ARBO, M. M. Trichome complement of *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 144, p. 85-97, 2004.

GRUNDHOFER, P. et al. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57, p. 915-927, 2001.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Pharmacology**, v. 56, p. 683-687, 2001.

GUERREIRO, K.K. et al. Análise farmacobotânica de folha e caule de *Tanacetum vulgare* (L.). **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 18, n. 1, p. 89-95, 2015.

HAN, Y., Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.

HENNEBERG, R. **Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de pacientes de hemoglobina s**. 2013. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

HESS, S. et al. Assessment of mechanismsinvolved in antinociception caused by myrsinoic acid B. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 209–215, 2010.

HIROTA, M. et al. Myrsinoic Acids B, C and F, Anti-inflammatory Compounds from *Myrsine seguinii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Japão, v. 66, n. 3, p. 655–659, 2002.

ISUZUGAWA, K. et al. Ca²⁺-Dependent Caspase Activation by Gallic Acid Derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 7, p. 844-847, 2001.

ITO S.; NARISE A.; SHIMURA S. Identification of a Methioninase Inhibitor, Myrsinoic Acid B, from *Myrsine seguinii* Le´v., and Its Inhibitory Activities. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Japan, v.72, n. 9, p. 2411–2414, 2008.

JAAFAR, H.Z.E.; IBRAHIM, M.H. The Relationship of Nitrogen and C/N Ratio with Secondary Metabolites Levels and Antioxidant Activities in Three Varieties of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Blume). **Molecules**, v. 16, p. 5514-5526, 2011.

JAAFAR, H.Z.E.; KARIMI, E. HPLC and GC-MS Determination of Bioactive Compounds in Microwave Obtained Extracts of Three Varieties of *Labisia pumila* Benth. **Molecules**, v. 16, p. 6791-6805, 2011.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry**, Irã, n.136, p. 237-244, 2013.

JANBAZ, A. et al. Protective effect of rutin on paracetamol and CC14 induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 557- 563, 2002.

JANUÁRIO, A. H. et al. Dammarane and cycloartane triterpenoids from three *Rapanea* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1251-1253, 1992.

JARAMILLO, C.J. et al. Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. **Revista de Biología Tropical**, Ecuador, v. 64, n.3, p. 1171-1184, 2016.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, 1940.

JÚNIOR, L.R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KARIMI, E.; JAAFAR H.Z.E. HPLC and GC-MS Determination of Bioactive Compounds in Microwave Obtained Extracts of Three Varieties of *Labisia pumila* Benth. **Molecules**, Malásia, n. 16, p. 6791-6805, 2011.

KIM, D. O. et al. Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

KIM, Y.J. Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1052-1055, 2007.

KOCZURKIEWICZ, P. et al. Triterpene saponosides from *Lysimachia ciliata* differentially attenuate invasive potential of prostate cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, Poland, n. 206, p. 6-17, 2013.

LEITE, A.C. et al. Trypanocidal activity of flavonoids and limonoids isolated from Myrsinaceae and Meliaceae active plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Carlos, v.1, n. 20, p. 1-6, jan\mar 2010.

LOCATELLI, C.; MONTEIRO, F.B.F.; PASA, T.B.C. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 233-239, 2013.

LOPES, V. et al. Pharmacological properties of *Anagallis arvensis* L. ("scarlet pimpernel") and *Anagallis foemina* Mill. ("blue pimpernel") traditionally used as wound healing remedies in Navarra (Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, Spain, n. 134, p. 1014-1017, 2011.

LORENCE, D.H., DWYER, J.D. A revision of *Deppa* (Rubiaceae). **Allertonia**, v. 7, p. 389-436, 1988.

LU, Y. et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 2-3, p. 102-107, 2010.

LUNA et al. Comparative leaf anatomy of neotropical *Stylogyne* species (Myrsinoideae – Primulaceae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 64, n.4, p. 717-726, 2013.

LUNA B. N. et al. Leaf secretory tissues in *Myrsine coriacea* and *Myrsine venosa* (Primulaceae): ontogeny, morphology, and chemical composition of essential oils. **Botany**, v.92, p. 757-766, 2014.

MA, J. et al. Bioactive Novel Polyphenols from the Fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 983-986, 2003.

MABBERLEY, D.J. **The plant book**. Cambridge: Cambridge University, p. 706, 1987.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 2512-2521, 2000.

MACIEL, et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

MACRINI, D.J et al. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.45, n.2, p. 715-721, abr/jun 2009.

MADIKIZELA B. et al. Ethnopharmacological study of plants from Pondoland used against diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, África do Sul, n.141, p. 61-71, 2012.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

MAHENDRAN, S. et al. Synthesis and Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Most Active Free Radical Scavenging Derivatives of Embelin—A Structure–Activity Relationship. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Índia, v. 59, n. 8, p. 913—919, 2011.

MAHMOUD, T.S. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456-464, 2011.

MANGURO et al. A flavonol glycoside from *Myrsine africana* leaves. **Phytochemistry**, v. 43, n.5, p. 1107-1109, 1996.

MAOMERI, M.; KHALALI, M.A.; TAVILI, A. Effects of *Haloxylon aphyllum* (Minkw.) Lejin extract on seeds germination and seedlings growth of *Agropyron Elongatum*

(Host.) and *Agropyron desertorum* (Fisch.). **Research Journal of Seed Science**, v. 4, p. 40-50, 2011.

MARCARINI, J.C. **Estudo do flavonóide rutina na citotoxicidade e análise de biomarcadores gênicos e bioquímicos de estresse genotóxico e oxidativo em cultura de células**. 2013. 155 f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP, 2013.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p. 127-130, 2001.

METCALFE, C.R.; CHALK. Anatomy of the dicotyledons. **Oxford Claredon Press**, v. 2, p. 1500, 1950.

MEYER, B. N., et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MEZ, C. Myrsinaceae. In: ENGLER H. G. A. das Pflanzenreich. Wilhelm Engelmann, Berlin, v. 4, p. 236, 1902.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIRANDA, M.A.F.M. **Atividades biológicas de duas espécies de *Myrsine* L. (Primulaceae) e de *Thitonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae)**. 2015. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências, Ecologia e Recursos Naturais) – Setor de Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

MIZUSHINA, Y. et al. Novel anti-inflammatory compounds from *Myrsine seguinii*, terpeno-benzoic acids, are inhibitors of mammalian DNA polymerases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Japão, n. 1475, p. 1-4, 2000.

MOHD, H.I. et al. Allocation of Secondary Metabolites, Photosynthetic Capacity, and Antioxidant Activity of *Kacip Fatimah* (*Labisia pumila* Benth) in Response to CO₂ and Light Intensity. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.1-13, 2014.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin **Journal of Science Technology**, v.26, n.3, p.211-219, 2004.

MORAIS, S.L. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

MOREIRA, F.P.M. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química nova**, Brasil, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

MOURA, A.C.S. et al. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. s1-s8, 2011.

MUNTEREANU, T.G.; CRUZ, R.S.; MELO-DE-PINA, G.F. Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. **Plant Systematic and Evolution**, v.296, p. 87-99, 2011.

NAIK, S.R. et al. Anti-diabetic activity of embelin: Involvement of cellular inflammatory mediators, oxidative stress and other biomarkers. **Phytomedicine**, Índia, n. 20, p. 797-804, 2013.

NEWELL, A.M.B. et al. Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 536-544, 2010.

NOVAES, P. et al. Phytotoxicity of leaf aqueous extract of *Rapanea umbellata* (Mart.) Mez (Primulaceae) on weeds. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 2, p. 231-239, April-June 2013.

O'BRIEN, T.P, FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OHTANI et al. Molluscicidal and antifungal triterpenoid saponins from *Rapanea melanophloeos* leaves. **Phytochemistry**, v. 33, n.1, p. 83-86, 1993.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Segunda edição. Atheneu. São Paulo, 1997.

OLIVEIRA, D.G. de. **Efeito da rutina em eritrócitos de ratos: estudo in vitro e in vivo**. 2001. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

OTEGUI, M. et al. Sinopsis del género *Myrsine* (Myrsinaceae) en el cono sur de América del Sur. **Candollea**, v. 53, p. 133-157, 1998.

OTEGUI, M.; MALDONADO, S. Morfologia foliar de las especies de *Myrsine* L. (Myrsinaceae) del Cono Sur de America del Sur. **Candollea**, v. 53, p. 349-363, 1998.

OZ, E. et al. Larvicidal activity of *Cyclamen* (Myrsinaceae) extracts against the larvae of West Nile virus vector *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Turkey, p. 449- 452, 2013.

PAULA, C. S. da. **Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia ungulata* L., Fabaceae**. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PATHAK, D. et al. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PEDRIALI, C.A. et al. The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an anti-radical agent. **Química Nova**, v. 31, p. 2147-2151, 2008.

PEREIRA, J. C. **Potencial alelopático e estudo fitoquímico dos extratos aquosos e etanólicos de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. e *Paspalum maritimum* Trind.** 2017. 145 f. Tese (doutorado em Proteção de Plantas), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2017.

PETRÔNIO, M.S. et al. Atividade antifúngica de ácido gálico e seus ésteres semi-sintéticos. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, São Paulo.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Tecnologia de sementes: Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 265-282.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, São Paulo, p. 1-6, 2017.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.

RIBEIRO, J.P.N. et al. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 1, p. 183-188, 2009.

ROCHA, W.S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – São Paulo, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

RODRIGUES, K. C. S. **Verificação da atividade alelopática de *Myrciaria cuspidata* Berg. (Camboim).** 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Botânica) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ROOME, T. et al. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Paquistão, n. 118, p. 514–521, 2008.

RUDALL, P. Anatomy of flowering plants: an introduction to structure and development. 2. ed. **Cambridge: Cambridge University**, p. 158, 1994.

SANTOS, K. F. R. et al. Hypolipidaemic effects of neringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacology Research**, v. 40, n. 6, p. 493-496, 1999.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Second edition. Iowa State College: Ames, 1951.

SHIM, D. O. et al. Lysimachia clethroides Duby extract attenuates inflammatory response in Raw 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide and in acute lung injury mouse model. **Journal of Ethnopharmacology**, República da Coréia, n. 150, p. 1007 – 1015, 2013.

SILVA, C. B. **Asemeia extraaxillaris (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (Polygalaceae) E Microlobius foetidus (Subsp. Paraguensis (Benth.) M. Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae): CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida)**. 2014. 316 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SILVA, F.M; AQUILA, M.E.A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.4, p.547-555, 2006.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. 357 p.

SUFFREDINI I. B.; VARELLA A. D.; YOUNES R. N. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 127-129, 2007.

SULAIMAN, H. et al. Anti-tumor effect of *Ardisia crispa* hexane fraction on 7, 12 dimethylbenz[α] anthracene-induced mouse skin papillomagenesis. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, Malásia, v. 8, n. 3, p. 404- 410, 2012.

SUMINO, M. et al. Ardisiphenols and other antioxidant principles from the fruits of *Ardisia colorata*. **Chemical Pharmacological Bulletin**, v.50, p. 1484-1487, 2002.

STAHL, B.; ANDERBERG, A. A. Myrsinaceae. In: KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. Volume 6. Berlin: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2004. p. 266- 281.

TEIXEIRA, S.P. et al. Secretory cavities and pellucid dots in leaflets of *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 221, p. 61-68, 2000.

THE PLANT LIST. *Myrsine parvula* (Mez) Otegui. Versão 1.1. 2013. Disponível em: <[http:// www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2503034](http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2503034)>. Acesso em: 25 ago. 2016.

TOVAR R.T., PETZEL, R.M. Herbal toxicity. **Diseases-a-month**, v.55, n.10, p.592– 641, 2009.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em:
<<http://www.tropicos.org/Name/50089491>> .Acesso em: 03/2016.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P. et L. A Triterpenoid saponin from *Maesa Ramentacea*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 491-495, 1997.

VIEGAS JR, C; BOLZANI, V. S. da; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, Apr. 2006.

WALLER, G.R.; FEUG, M.C. & FUJII, Y. Biochemical analysis of allelopathic compounds: plants, microorganisms, and soil secondary metabolites. In: INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M. & FOY, C.L. (Eds.) **Principles and practices in plant ecology**. Boca Raton, CRC Press, p.75-98, 1999.

WANG, J. et al. Protective effect of *Lysimachia christinae* against acute alcohol-induced liver injury in mice. **BioScience Trends**, v.2, n.6, p. 89-97, 2012.

WERNER et al. Analysis of gallic acid biosynthesis via quantitative prediction of isotope labeling patterns. In: GROSS, G.G., HEMINGWAY, R.W., YOSHIDA, T. (Eds.). **Plant Polyphenols 2. Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999. p. 43–61.

WOSCH, L. et al. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves. I. A morpho-anatomical profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 328-343, 2015.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica moderna da química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

ANEXO 1 AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO
GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,
DE 27 DE ABRIL DE 2011
Nº 03/2014**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, relatório anual sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Volney Zanardi Junior
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.